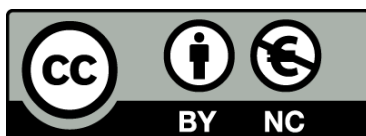




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Análisis molecular de los ganglios linfáticos en carcinoma colorectal precoz

María Teresa Rodrigo Calvo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS EN CARCINOMA COLORRECTAL PRECOZ

Memoria de tesis doctoral presentada por

María Teresa Rodrigo Calvo

para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por

Dra. Miriam Cuatrecasas Freixas

Profesora Agregada. Departamento de
Fundamentos Clínicos. Universitat
de Barcelona
Adjunta de la Sección de Patología Torácica,
Digestiva y Metabólica. Servicio de
Anatomía Patológica. Hospital Clínic de
Barcelona

Dra. María Alba Díaz Lorca

Profesora Agregada. Departamento
de Fundamentos Clínicos. Universitat
de Barcelona
Jefa de Sección de Patología Torácica
Digestiva y Metabólica. Servicio de
Anatomía Patológica. Hospital Clínic de
Barcelona

Tutora: Miriam Cuatrecasas Freixas

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Marzo, 2024

Agradecimientos

A mi directora de tesis, la Dra. Miriam Cuatrecasas, por su experiencia, sus consejos y por transmitirme su pasión por la investigación. Todo ello indispensable en la presente tesis.

A mi directora de tesis, la Dra. Alba Díaz, por su confianza, por no dejar que desespere, por su apoyo científico y sobre todo emocional.

A Karmele, por ser parte importante de esta tesis, la mitad se la debo a ella, sin su ayuda no lo hubiera conseguido.

A Sandra, por enseñarme y ayudarme en la parte de laboratorio, y por tener grandes ideas en parte de este trabajo.

A Iván, por apoyarme y ser mi guía en este recorrido doctoral.

A Isabel, mi compañera de tesis, empezamos y acabamos juntas.

Al resto de miembros del equipo de Anatomía patológica que han participado en las publicaciones y en los ánimos.

A mis amig@s por estar ahí y confiar en que pudiera acabar la tesis, parecía algo imposible. ¡Lo he conseguido!

A Santiago (de Compostela, Galicia), por darme calma para escribir toda la memoria en mi estancia de dos meses.

A mis padres y a mi hermano, por creer en mí y apoyarme sin dudar, siempre animándome y empujándome a conseguir todo lo que me propongo.

A Jan, por su apoyo incondicional en todo lo que hago y acompañarme en este camino tanto profesional como personal.

A los pacientes con cáncer de colon, que han cedido sus muestras para hacer este trabajo ☺

Índice

Índice de figuras.....	9
Listado de acrónimos	10
Tesis en formato de compendio de publicaciones	13
Introducción.....	17
1	Características Generales del Cáncer Colorrectal
.....	17
1.1. Epidemiología Global del CCR.....	17
1.2. Factores de riesgo del CCR	18
1.2.1. Factores Ambientales	18
1.2.2. Factores genéticos.....	19
1.2.3. Otros factores de riesgo de CCR.....	23
1.3. Desafíos y Tendencias en la Detección y Prevención del CCR.....	25
2	Caribado del Cáncer Colorrectal
.....	26
2.1. Estrategia Clave para Reducir el Riesgo Global de CCR	26
2.2. Detección del CCR precoz.....	27
2.3. Pruebas de cribado	28
2.3.1. Pruebas de cribado en las heces.....	28
2.3.2. Pruebas de cribado endoscópicas.....	30
2.3.3. Otras pruebas de cribado no invasivas.....	31
3	Carcinoma colorrectal pT1
.....	34
3.1. Factores histológicos de riesgo de metástasis ganglionares en el CCR pT1.....	35
3.1.1 Invasión vascular	35
3.1.2. Grado histológico	37
3.1.3. Tumor budding.....	39
3.1.4. Poorly differentiated clusters.....	41
3.1.5. Profundidad de invasión submucosa	42
3.1.6. Márgenes de resección.....	46
3.2. Linfangiogénesis: Un enfoque detallado.....	47

4	Estadificación del Cáncer. TNM	51
4.1	Enfoque en las micrometástasis.....	53
5	Método One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA). Generalidades	54
5.1.	Método OSNA en Cáncer de Mama	56
5.2.	Método OSNA en Cáncer Colorrectal	57
5.2.1.	Disección de ganglios linfáticos en fresco en el CCR y diagnóstico del estadio pN con extensiones citológicas	58
Hipótesis.....		63
Objetivos		67
Material, métodos y resultados		71
Primer estudio		71
Segundo estudio		83
Discusión.....		99
Conclusiones.....		113
Bibliografía		117

Índice de figuras

Figura 1. Tasas de incidencia estandarizadas por edad y sexo, específicas para los cánceres de (A) colon y (B) recto.

Figura 2. Gráfico circular que muestra la marcada heterogeneidad genotípica y fenotípica de los síndromes hereditarios de cáncer colorrectal.

Figura 3. Vías genéticas de la carcinogénesis colorrectal.

Figura 4. Otras vías genéticas de la carcinogénesis colorrectal.

Figura 5. Carcinoma colorrectal diagnosticado en programas de cribado poblacional.

Figura 6. Imagen de invasión linfovascular de adenocarcinoma de colon en la submucosa colónica.

Figura 7. Imagen de una invasión venosa extramural.

Figura 8. Representación de adenocarcinomas de diferentes grados de diferenciación.

Figura 9. *Tumor budding y Poorly Differentiated Clusters.*

Figura 10. Clasificación de Kikuchi de la invasión submucosa (Sm) de CCR pT1.

Figura 11. Clasificación de Haggim de la invasión submucosa en pólipos pediculados y sésiles.

Figura 12. Medición de la profundidad de invasión submucosa en pólipos pediculados y sesiles.

Figura 13. Imagen histológica de un CCR pT1 con margen de resección profundo positivo, con artefacto de cauterio.

Figura 14. Estadiaje pT del CCR en función del grado de infiltración.

Figura 15. Estadios pronósticos en CCR.

Listado de acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJCC: American Joint Commission on Cancer

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CCR: Cáncer colorrectal

CEC: Cápsula endoscópica de colon

CIMP: Fenotipo metilador de islas de CpG (CpG island methylator phenotype)

CK19: Citoqueratina 19

CNA: Alteración en el número de copias (Copy number alteration)

CTC: Colonografía por tomografía computerizada

CTT: Carga Tumoral Total

GL: Ganglio linfático

GLC: Ganglio linfático Centinela

H&E: Hematoxilina y eosina

Hb: Hemoglobina

IHQ: inmunohistoquímica

ILV: Invasión linfovascular

IPN: Invasión perineural

ITB: Budd tumoral intra-tumor

MMR: Mismatch repair

MSI: Inestabilidad de microsatélites

MSS: Estabilidad de microsatélites

OSNA: One Step Nucleic Acid Amplification

PDC: Clusters pobremente diferenciados (*Poorly differentiated clusters*)

PTB: Budd tumoral peri-tumor

RT-LAMP: Amplificación isotérmica en loop mediada por transcripción inversa
(*Reverse Transcripción Loop-mediated Isothermal Amplification*)

RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real con transcripción inversa (*Reverse Transcriptase and Real-Time Polymerase Chain reaction*)

SOH: Sangre oculta en heces

SOHg: Sangre oculta en heces mediante método del guayaco

SOHi: Sangre oculta en heces inmunológico

TB: Tumor *budding*

TC: Tomografía computarizada

VL: Vaso linfático

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo

TESIS EN FORMATO DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

ARTÍCULO 1

Tumour Cell Seeding to Lymph Nodes from In Situ Colorectal Cancer

Maria Teresa Rodrigo-Calvo, Karmele Saez de Gordo, Sandra Lopez-Prades,
Ivan Archilla, Alba Diaz, Mario Berrios, Jordi Camps, Eva Musulen, Miriam
Cuatrecasas

Cancers (Basel). 2023 Jan 30;15(3):842

FI: 5.2. Q2

Objetivos:

- Realizar un análisis detallado de las cargas tumorales totales en los ganglios linfáticos de pacientes con carcinoma colorrectal en estadios pTis utilizando el método OSNA
- Determinar el significado patológico de las cargas tumorales detectadas y establecer relaciones entre estos resultados con la presencia y cantidad de vasos linfáticos en la lámina propia, utilizando el marcador inmunohistoquímico D2-40.
- Explorar la correlación con factores clínico-patológicos relevantes en el CCR con el fin de obtener información que permita mejorar la toma de decisiones clínicas y el manejo terapéutico de los pacientes con CCR in situ.

ARTÍCULO 2

Lymph node molecular analysis with OSNA enables to identify pT1 CRC patients at risk of recurrence. A multicentre study

Karmele Saez de Gordo*, **Maria Teresa Rodrigo-Calvo***, Ivan Archilla, Sandra Lopez-Prades, Alba Diaz, Jordi Tarragona, Isidro Machado, Juan Ruiz Martín, Diana Zaffalon, María Daca-Alvarez, Maria Pellisé, Miriam Cuatrecasas

Cancers (Basel). 2023 Nov 20;15(22):5481

FI: 5.2. Q2

Objetivos:

- Realizar un análisis detallado de las cargas tumorales totales en los ganglios linfáticos de pacientes con carcinoma colorrectal en estadios pT1 utilizando el método OSNA
- Explorar la correlación con factores clínico-patológicos relevantes en el CCR con el fin de obtener información que permita mejorar la toma de decisiones clínicas y el manejo terapéutico de los pacientes con CCR pT1.

Introducción

Introducción

1 Características Generales del Cáncer Colorrectal

1.1. Epidemiología Global del CCR

A nivel mundial, el cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer lugar en incidencia tanto en hombres como en mujeres, y el segundo lugar en mortalidad, después del cáncer de mama y próstata (1). Las tasas de incidencia son cuatro veces más altas en los países desarrollados que en los países de renta baja, pero hay menos variación en las tasas de mortalidad debido a que ésta es mayor en estos últimos. La incidencia de cáncer de colon y recto tienden a ser bajas en la mayoría de las regiones de África y en el sur de Asia central. El cáncer de colon muestra una variación en su incidencia de hasta nueve veces según la distribución geográfica, siendo más alta en Europa, Australia/Nueva Zelanda y América del Norte, con Hungría y Noruega ocupando el primer lugar en hombres y mujeres, respectivamente (Fig. 1A). La incidencia del cáncer de recto tiene una distribución geográfica similar, aunque es más alta en Asia oriental (Fig. 1B).

El CCR puede considerarse un marcador de desarrollo socioeconómico. Así, las tasas de prevalencia tienden a aumentar de manera uniforme en los países de rentas más altas (2,3).

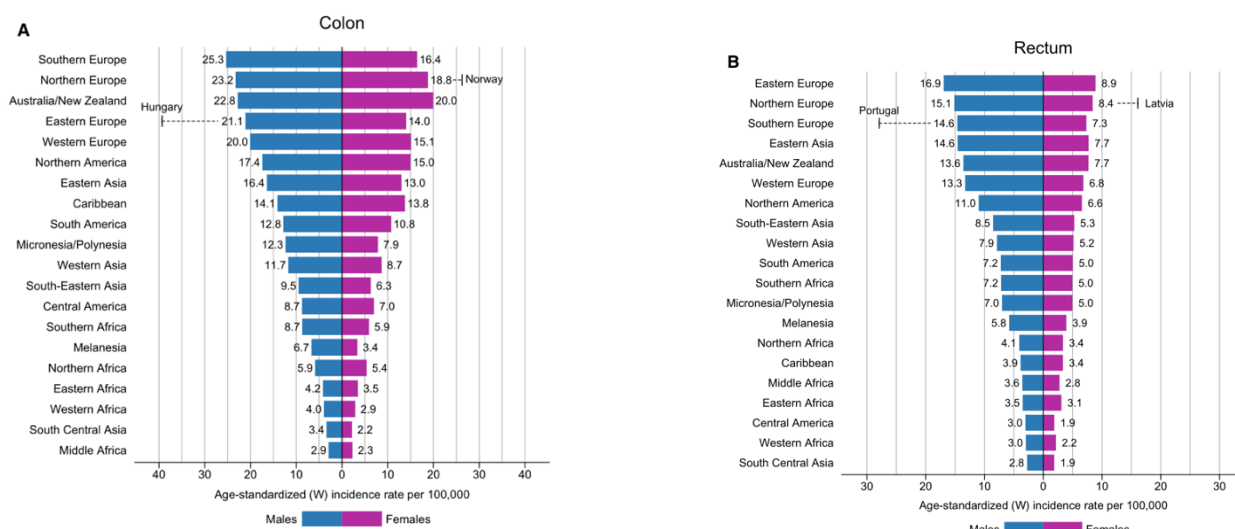


Figura 1. Tasas de incidencia estandarizadas por edad y sexo, específicas por región para los cánceres de (A) colon y (B) recto en 2020. Adaptado de Sung et al (1).

1.2. Factores de riesgo del CCR

1.2.1. Factores Ambientales

El aumento de la incidencia de CCR en países como Europa del Este, Asia sudoriental, central meridional, y América del Sur, probablemente refleja cambios en factores ambientales como el estilo de vida y la dieta, es decir, cambios hacia una mayor ingesta de alimentos de origen animal y un estilo de vida más sedentario, lo que lleva a una disminución de la actividad física y una mayor prevalencia del exceso de peso corporal, que se asocian de forma independiente con el riesgo de CCR (4). Otros factores de riesgo adicionales incluyen el consumo de alcohol, el tabaquismo y el consumo de carne roja o

procesada, mientras que los suplementos de calcio y el consumo de cereales integrales, fibra y productos lácteos contribuyen a disminuir el riesgo de CCR (5).

1.2.2. Factores genéticos

La mayoría de los CCR surgen esporádicamente a través de alteraciones genómicas somáticas adquiridas, mientras que un 35 - 40 % de los casos están asociados a susceptibilidad hereditaria al CCR. Los componentes hereditarios son aportados por la historia familiar de CCR, los síndromes de cáncer hereditario, las variaciones genéticas comunes conocidas pero de baja penetrancia y otras alteraciones hereditarias aún desconocidas. Independientemente de si los CCR surgen de forma esporádica o tienen componentes hereditarios (Fig. 2), los factores ambientales pueden influir en su desarrollo (6).

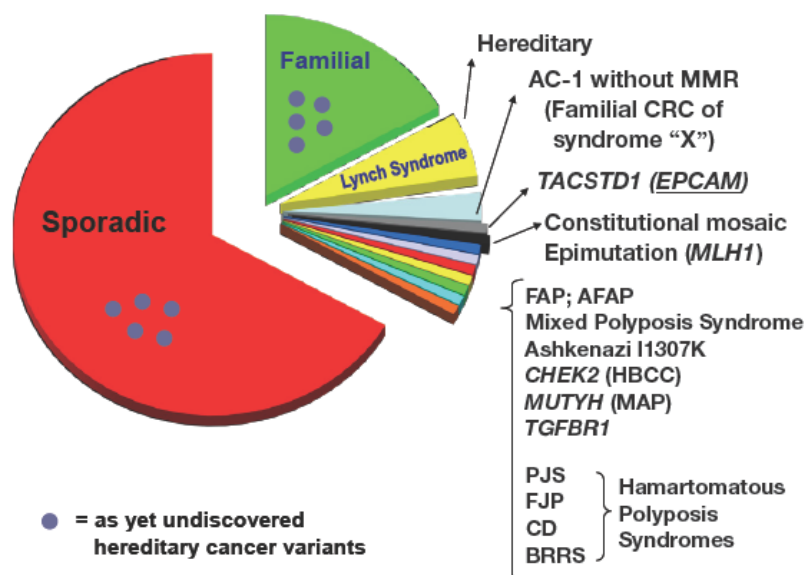


Figura 2. Gráfico circular que muestra la marcada heterogeneidad genotípica y fenotípica de los síndromes hereditarios de cáncer colorrectal. Adaptado de Lynch et al (7).

La mayoría de los CCR se originan en lesiones precursoras polipoides. Este proceso comienza con una cripta aberrante, evolucionando hacia una lesión precursora de neoplasia y eventualmente progresa a CCR durante un período estimado de 10 a 15 años. Actualmente se supone que la célula de origen de la mayoría de los CCR es una célula madre o una célula similar a una célula madre. Estas células madre cancerosas son el resultado de una acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que inactivan genes supresores de tumores y activan oncogenes. Las células madre cancerosas residen en la base de las criptas del colon y son esenciales para el inicio y mantenimiento de un tumor. Los mecanismos reguladores que controlan el crecimiento de estas células madre cancerosas es un área de investigación prometedora para la introducción de posibles agentes terapéuticos y tratamiento preventivo.

Existen tres vías moleculares principales distintas del CCR (Fig. 3): a) la vía de inestabilidad cromosómica, que representa un 70-75% de los CCR esporádicos o convencionales y siguen la secuencia adenoma-carcinoma, b) la vía de inestabilidad de microsatélites (MSI), que representa un 3-5% de los CCR, c) la vía serrada de la carcinogénesis colorrectal, que representa un 20-30% de los CCR. La vía serrada en realidad no es una vía molecular, sino que podemos considerarla una vía morfológica, dado que los CCR desarrollados en esta vía se originan a través de dos mecanismos moleculares, la vía de inestabilidad de microsatélites esporádica y el fenotipo metilador de las islas de CpG o CIMP. Estas vías presentan múltiples eventos genéticos y epigenéticos distintos en un orden secuencial. Los fenotipos de inestabilidad cromosómica generalmente se desarrollan después de eventos genómicos iniciados por una mutación de *APC*, seguidos de la activación de *RAS* o la pérdida de función de *TP53*. Por el contrario, en la vía de la neoplasia serrada son relativamente poco frecuentes la mutación e inactivación de *APC*, y cuando están presentes, no suelen hacerlo como primeros pasos en el proceso de carcinogénesis. Así, la mayoría de CCR

desarrollados por esta vía muestran mutaciones de *BRAF*, y con menos frecuencia de *K-RAS*, además de inestabilidad epigenética, caracterizada por el fenotipo de metilación de islas CpG. Algunos estudios también han identificado nuevos marcadores y subtipos fenotípicos en función de las mutaciones presentes, como la presencia de polimerasa- ϵ , mutaciones *POLE* o deficiencia de reparación de errores de transcripción (dMMR) que conducen a un fenotipo hipermutado (5).

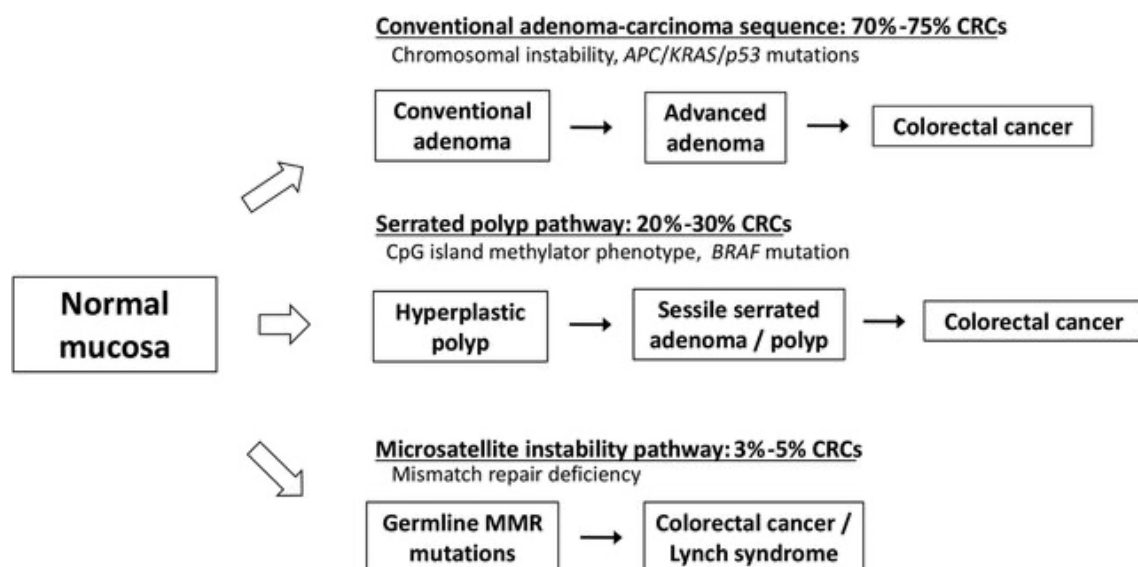


Figura 3. Vías genéticas de la carcinogénesis colorectal. Esquema de los cambios genéticos y epigenéticos secuenciales que ocurren en las tres vías implicadas en la patogénesis del CCR: inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad de microsatélites (MSI) y vía serrada. Adaptado de Li et al (8)

Se estima que el riesgo acumulado de desarrollar CCR antes de los 75 años es del 5 % en la población general de un país de alta incidencia como Corea, Noruega, Eslovaquia o Eslovenia. Sin embargo, el riesgo de CCR de por vida

aumenta considerablemente cuando existen antecedentes familiares de CCR o síndromes de cáncer hereditario (9).

Describiremos a continuación los dos síndromes hereditarios más frecuentes de CCR.

1.2.2.1. Síndrome de Lynch

El síndrome de Lynch o CCR hereditario no asociado a poliposis (en inglés HNPCC), es el síndrome de CCR hereditario más común, con una prevalencia estimada de 1 de cada 300 individuos en poblaciones occidentales, representando el 2 al 4 % de todos los casos de CCR, con un riesgo de desarrollar CCR del 60-80% a lo largo de la vida en los pacientes afectados (10). El sello distintivo del síndrome de Lynch es el desarrollo de CCR con MSI, causado por mutaciones genéticas en la línea germinal de cualquiera de los genes de reparación de errores de transcripción del ADN, incluidos *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* y *hPMS2*. En el síndrome de Lynch la secuencia de desarrollo del CCR es la convencional adenoma-carcinoma, pero en un periodo de 2 a 3 años, a diferencia de los 8 a 10 años del CCR esporádico. Histológicamente los CCR asociados al síndrome de Lynch suelen tener rasgos histológicos característicos, como ser poco diferenciados, mucinosos y presentan abundantes linfocitos intraepiteliales y peritumorales (8). Los CCR esporádicos con MSI están causados por un mecanismo epigenético de silenciamiento de *MLH1* mediante hipermetilación de promotor del gen, y representan un 15% de los CCR esporádicos.

1.2.2.2. Poliposis adenomatosa familiar

La segunda forma más común de síndrome de CCR hereditario es la poliposis adenomatosa familiar (PAF), que afecta aproximadamente a 1 de cada

11.300 a 37.600 personas en la Unión Europea. Está causada por mutaciones heredadas en la línea germinal del gen *APC*. Las mutaciones en *APC* son uno de los eventos iniciales del CCR esporádico de la vía de inestabilidad cromosómica, pero representan mutaciones somáticas adquiridas. La PAF se caracteriza por el desarrollo de cientos a miles de adenomas, principalmente en el colon distal, con inicio en la adolescencia, y con un riesgo de desarrollar CCR prácticamente del 100% a los 40 años si el colon y, a veces, el recto, no se resecan de forma profiláctica. Sin embargo, la PAF representa <1% de todos los casos de CCR (11).

1.2.3. Otros factores de riesgo de CCR

Existe una vía de carcinogénesis distinta que implica inflamación crónica, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EII), colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Fig. 4). En un metaanálisis de ocho estudios de cohortes con un seguimiento promedio de 14 años tras el diagnóstico de colitis ulcerosa, observaron que existe un riesgo estimado de desarrollar CCR de 2,4 veces mayor (IC del 95% 2,1-2,7) que el de la población general (12). En estos pacientes el proceso de carcinogénesis progresa de la displasia de bajo grado, a alto grado y, finalmente, al CCR. En este modelo, la displasia que surge en el contexto de la inflamación crónica-reparación, y frecuentemente presenta multifocalidad. Así, existe un defecto de campo en la mucosa sometida a un proceso de inflamación-reparación, sobre el que se desarrollan una o múltiples lesiones precursoras visibles o no visibles. Estas lesiones precursoras se han dividido en convencionales (adenomas tubulares y tubulovelloso) y no convencionales (hiperplasia hiper mucinosa, lesiones de tipo serrado, y otras) (5,13,14). La mayor parte de la bibliografía sobre displasia se refiere a la displasia convencional (o de tipo intestinal), que es la forma de displasia más conocida. Sin embargo, la displasia no convencional incluye al menos seis subtipos:

(1) hiperplasia hipermucinosa: Lesión frecuentemente de tipo tubulovelloso/velloso revestida por células mucinosas altas con núcleos ligeramente alargados e hipercromáticos. El componente hipermucinoso debe representar >50% de la lesión.

(2) displasia deficiente en células caliciformes (GCD): Lesión tubular con displasia de bajo grado, revestida por células de tipo intestinal con núcleos en su mayoría alargados e hipercromáticos que afectan tanto a las criptas como al epitelio superficial. Ausencia total o casi total de células caliciformes.

(3) displasia con diferenciación epitelial terminal (TED; también conocida como displasia de células de la cripta [CCD]): Mucosa plana revestida por núcleos en su mayoría redondos a ovalados, no estratificados. La atipia se limita a la base de la cripta sin afectación de la superficie.

(4) adenoma tipo serrado tradicional (AST): Morfológicamente como el AST. Lesión tubulovelloso/velloso revestida por células columnares con núcleos mayoritariamente alargados, citoplasma intensamente eosinófilo y criptas ectópicas, que crean un perfil serrado. El componente de AST debe representar >50% de la lesión.

(5) lesión tipo serrada sésil (LSS): Lesión tubular con serración y dilatación prominentes en la base y la superficie de las criptas, incluidas criptas dilatadas en forma de L o T invertida en la interfase con la muscularis mucosa. El componente de tipo LSS debe representar >50% de la lesión.

(6) lesión tipo serrada no especificada (NOS).

Al igual que en la displasia convencional, p53 parece desempeñar un papel importante en el desarrollo de la displasia hipermucinosa y TED/CCD, mientras que las alteraciones combinadas de p53 y β -catenina son comunes en las lesiones de tipo serrado. Cabe señalar que el TED/CCD comparte características

morfológicas similares con la recientemente descrita "atipia de células de la cripta (CCA)", salvo que las células displásicas no deben afectar a la superficie mucosa en la CCA. El CCA se ha definido como un leve agrandamiento e hiperchromasia de núcleos ligeramente irregulares, pero en su mayoría no estratificados, limitados a la base de la cripta sin afectación de la superficie (15,16).

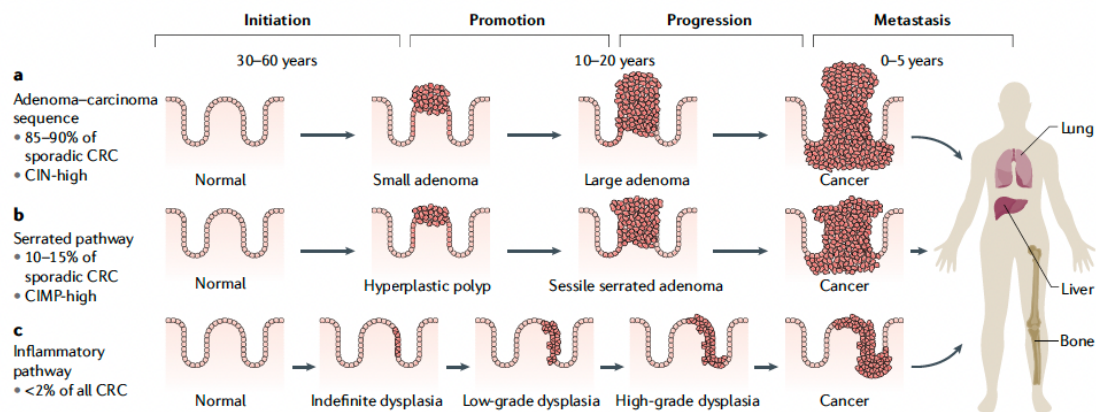


Figura 4. Otras vías genéticas de la carcinogénesis colorectal. inestabilidad de microsatélites (MSI) y vía serrada. Adaptado de Keum et al (6).

1.3. Desafíos y Tendencias en la Detección y Prevención del CCR

La disminución en la incidencia del CCR en algunos países se han atribuido a los programas de cribado para la detección precoz y secundariamente a los cambios a nivel de población hacia opciones más saludables respecto a estilos de vida, dietas saludables, mayor actividad física y disminución del alcohol y tabaquismo (17-19). Sin embargo, las tendencias favorables para los adultos ≥ 50 años enmascaran tasas crecientes de cáncer colorrectal de aparición temprana, con edad en el momento del diagnóstico < 50 años, en muchos países, incluidos Estados Unidos, Canadá, Australia y otros seis países de renta alta, con

una incidencia que aumenta entre un 1% y un 4% por año (20). Aunque la incidencia va en aumento en cohortes de personas jóvenes, consecuencia de la influencia de los patrones dietéticos menos saludables, el exceso de peso corporal y los factores del estilo de vida, es preciso investigar en profundidad para dilucidar factores causales subyacentes específicos porque la información sobre los factores de riesgo se basa actualmente, y casi exclusivamente, en datos de cohortes de mayor edad. Para mitigar la creciente incidencia del CCR en edad precoz, la American Cancer Society redujo la edad recomendada para el inicio de las pruebas de detección para personas con riesgo medio de 50 a 45 años (21).

2 Cribado del Cáncer Colorrectal

2.1. Estrategia Clave para Reducir el Riesgo Global de CCR

La prevención secundaria consiste en detectar la enfermedad y tratarla precozmente antes de que aparezcan los síntomas, lo que minimiza las consecuencias graves, por lo que sigue siendo la estrategia clave para reducir el creciente riesgo global de CCR.

El objetivo de los programas de cribado de CCR es reducir la incidencia, mediante la detección y resección de las lesiones precursoras, y la mortalidad por CCR. El cribado en la población de riesgo medio, individuos con edad ≥ 50 años sin factores de riesgo adicionales, se contempla en la perspectiva del cribado poblacional organizado (22,23). El cribado poblacional es una iniciativa coordinada por la administración sanitaria, que implica invitar de manera individual y sistemática a la población con riesgo medio a someterse a pruebas de cribado. Además, se encarga de asumir el tratamiento y seguimiento de los pacientes diagnosticados de CCR. La implementación de este programa ha

contribuido a la disminución de la incidencia y mortalidad asociadas al CCR (24,25).

2.2. Detección del CCR precoz

El CCR se desarrolla a partir de una lesión premaligna, que en más del 70 % de los casos corresponde a la secuencia adenoma-carcinoma. La progresión adenoma-carcinoma es un proceso lento que puede prolongarse aproximadamente 10 años (25). Las pruebas de cribado permiten la detección de la enfermedad en su fase inicial o de la lesión precursora. El pronóstico de los pacientes con CCR depende del estadio en el que se diagnostica la enfermedad, siendo la supervivencia en los estadios precoces I y II (pT1 a pT4, pN0) del 75%

La implementación de programas de cribado del CCR ha aumentado la detección del CCR precoz en estadios I y II, (Fig. 5) de forma que estos representan el 70% de los CCR detectados en programas de cribado (20,21,24,25).

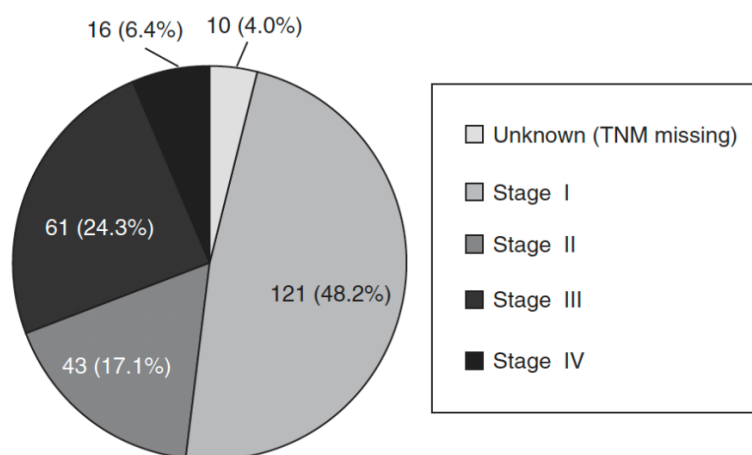


Figura 5. Carcinoma colorrectal diagnosticado en programas de cribado poblacional. Adaptado de Burón et al (26).

2.3. Pruebas de cribado

Las pruebas de detección del cáncer colorrectal se clasifican en cuatro categorías:

- 1) pruebas en las heces (incluyendo la sangre oculta en heces (SOH) y la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) fecal);
- 2) pruebas endoscópicas (sigmoidoscopia y la colonoscopia);
- 3) pruebas de imagen (colonografía por tomografía computarizada (TC) y la cápsula endoscópica de colon (CEC)); y
- 4) biomarcadores en la sangre periférica (como el ADN metilado de Septina9 y el miRNA).

En países europeos, anglosajones y asiáticos, la estrategia predominante para el cribado poblacional incluye la detección de de sangre oculta en heces inmunológica (SOHi) cada dos años, seguida de la colonoscopia en casos con resultado positivo, o la sigmoidoscopia, con o sin la prueba anual de sangre oculta en heces inmunológica (SOHi) (24,27).

2.3.1. Pruebas de cribado en las heces

2.3.1.1. Sangre oculta en las heces

Existen dos métodos para la detección de hemoglobina (Hb) en las heces: el químico (guayaco) y el inmunológico. El test de sangre oculta en las heces mediante el método de guayaco (SOHg) se fundamenta en la actividad pseudoperoxidasa del grupo heme, que induce la oxidación del guayaco mediante la adición de peróxido de hidrógeno Este test puede realizarse con o

sin rehidratación. Para garantizar resultados fiables y evitar falsos positivos o negativos, el test de SOHg requiere la recolección de tres muestras, realizar una dieta previa especial durante tres días (que excluye carnes rojas y cítricos) y la abstención de tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los suplementos de vitamina C (28).

Los métodos inmunológicos, SOHi, emplean anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra la globina humana, permitiendo la detección de concentraciones de hemoglobina entre 10 y 300 µg/g de heces. Estos métodos pueden ser cualitativos o cuantitativos, posibilitan la toma de una sola muestra y no requieren restricciones dietéticas previas ni la interrupción de la ingesta de medicamentos (28).

Las pruebas de cribado en las heces carecen de efectos adversos directos. La evidencia existente se refiere a los efectos adversos de las colonoscopias derivadas de la positividad de las pruebas de SOH (22,27).

2.3.1.2. Análisis del Ácido Desoxirribonucleico Fecal

La evaluación del ADN presente en las heces, derivado de la exfoliación de células tumorales intestinales, posibilita la identificación de alteraciones moleculares presentes en adenomas, lesiones serradas avanzadas y en CCR. Este enfoque no invasivo puede llevarse a cabo en casa sin necesidad de imponer restricciones dietéticas, medicamentos o preparación previa del colon. En caso de obtener un resultado positivo, se recomienda realizar una colonoscopia para confirmar o descartar la presencia de estas lesiones (29).

Los metaanálisis sobre la validez diagnóstica de la prueba muestran una gran heterogeneidad en relación con los estándares de referencia empleados, grupos de edad evaluados y distintos marcadores moleculares incluidos en cada test (30). Sin embargo, La falta de información sobre el posible impacto en la incidencia y mortalidad por CCR, el elevado coste asociado, la mayor complejidad técnica de las pruebas con diversos marcadores y la relación coste-efectividad menos favorable en comparación con otras estrategias de cribado, restringen su utilidad como prueba de cribado principal (31).

2.3.2. Pruebas de cribado endoscópicas

2.3.2.1. Colonoscopia

La colonoscopia posibilita la observación directa de la mucosa de todo el colon y el recto. En el caso de la colonoscopia de cribado, se suele realizar tras un test de sangre oculta en heces positivo, y es esencial que sea completa, abarcando la exploración hasta el ciego con visualización de la válvula ileocecal o el orificio apendicular, y de alta calidad, con una preparación adecuada en más del 90% de los casos (32). Para llevar a cabo la colonoscopia, se requiere sedación mediante fármacos intravenosos, una dieta baja en residuos en los días previos y la limpieza anterógrada del colon mediante la administración de una solución evacuable junto con la ingesta de 2-4 litros de agua. Durante la retirada del endoscopio, es crucial realizar una exploración minuciosa, la cual debe extenderse por un mínimo de 6-8 minutos (33,34).

Los riesgos directos asociados a la colonoscopia de cribado comprenden la perforación intestinal, hemorragia con o sin necesidad de hospitalización, y el síndrome postpolipectomía, que resulta de la progresión de

la electrocoagulación endoscópica hasta la serosa después de una polipectomía. Esto resulta en una quemadura transmural pero que no llega a perforar la pared colónica, además de los riesgos que surgen de la preparación para la limpieza del colon (24,29).

2.3.2.2. Sigmoidoscopia

La sigmoidoscopia flexible implica el uso de un endoscopio que permite examinar la superficie mucosa hasta 60 cm del margen anal, abarcando el recto, sigma y parte del colon descendente. Esta exploración se lleva a cabo después de la limpieza del colon con enemas y no requiere sedación. En caso de obtener un resultado positivo, es decir, que se encuentren pólipos, se recomienda realizar un examen completo del colon mediante colonoscopia (32).

La sigmoidoscopia se considera una técnica relativamente segura. Los eventos adversos graves, como la perforación intestinal, la hemorragia o la muerte, son menos frecuentes que con la colonoscopia (29).

2.3.3. Otras pruebas de cribado no invasivas

En los últimos años se han incorporado métodos alternativos a las pruebas de cribado convencionales (test de SOH y pruebas endoscópicas directas), de carácter no invasivo, que pueden contribuir a mejorar la adherencia actual al cribado de CCR.

2.3.3.1. Colonografía por Tomografía Computarizada

Consiste en la obtención de imágenes tomográficas después de insuflar el colon con aire o dióxido de carbono, seguido de su reconstrucción por ordenador en dos o tres dimensiones. La prueba requiere la misma preparación que para la colonoscopia, pero se realiza sin necesidad de sedación (29). Actualmente, se está evaluando la eficacia de llevar a cabo la colonografía por TC sin limpieza del colon y con marcado fecal mediante contraste oral (35). La captura de imágenes puede completarse en 5-10 minutos, aunque se necesitan 20-30 minutos adicionales para su reconstrucción e interpretación. En caso de obtener un resultado positivo con detección de pólipos o CCR, es imperativo realizar una colonoscopia, preferiblemente el mismo día o el día siguiente para evitar una nueva preparación intestinal (29,36).

La colonografía por TC es una prueba no invasiva con escasas complicaciones significativas. Los pacientes pueden experimentar molestias abdominales durante la insuflación del colon o como resultado de la limpieza intestinal (37). La perforación del colon puede ocurrir en 2 de cada 10.000 procedimientos (35,37) y disminuye si se utiliza dióxido de carbono en lugar de aire. Los riesgos potenciales asociados con la exposición periódica a dosis bajas de radiación son inciertos, pero se observa una tendencia temporal hacia la disminución de la dosis de exposición durante la colonografía por TC debido a mejoras tecnológicas y cambios en los protocolos (27,29).

2.3.3.2. Cápsula Endoscópica de Colon (CEC)

La CEC es un método mínimamente invasivo que permite explorar la totalidad de la mucosa colónica de forma segura sin necesidad de sedación, radiación o insuflación de aire, aunque requiere una limpieza previa del colon. Consiste en un dispositivo que mide 31,5 x 11,6 mm (Pillcam Colon Capsule® 2; CEC-2. Given Imaging Ltd. Yoqneam, Israel) con dos cámaras internas, sensores que se adhieren al abdomen, una grabadora acoplada a un cinturón externo que actúa como receptor y una batería de 10 horas de duración. Después de la ingesta, la CEC-2 emite imágenes con una frecuencia variable, desde cuatro imágenes cuando está en reposo hasta 35 imágenes cuando está en movimiento. Al finalizar la grabación, la información se descarga en una estación de trabajo para su lectura (38–40). Si la CEC-2 detecta pólipos o CCR, es necesario realizar una colonoscopia para confirmar el diagnóstico y, si es necesario, proceder con el tratamiento endoscópico, como polipectomía u otros (29,32).

No hay evidencia contrastada que respalde su indicación como prueba de cribado de primera línea. No existen estudios que evalúen el impacto del cribado con CEC en la mortalidad y detección del cáncer colorrectal. La CEC-2 es un procedimiento seguro con escasos efectos adversos (29).

2.3.3.3. Biomarcadores en la Sangre Periférica

El CCR surge como resultado de la acumulación progresiva de diversas alteraciones genéticas y epigenéticas. Esta situación abre la posibilidad de identificar biomarcadores asociados que podrían ayudar en la detección temprana del tumor o, idealmente, prevenir su desarrollo. Los biomarcadores

son moléculas o sustancias presentes en la mucosa del colon, así como en la sangre, saliva u otros fluidos biológicos de personas que presentan cáncer o lesiones precursoras. Su identificación podría mejorar de manera significativa el diagnóstico y tratamiento. Aunque el análisis de biomarcadores sanguíneos aún no se considera una estrategia recomendada para el cribado y diagnóstico del CCR, los avances recientes en proteómica y genómica sugieren que estas tecnologías podrían, en un futuro cercano, convertirse en alternativas o enfoques complementarios a las estrategias actualmente aceptadas. En la actualidad se están investigando diversos tipos de moléculas, como la metilación del ADN, miRNA y proteínas en pacientes con lesiones precursoras o CCR avanzado, aunque la evidencia en la población de cribado aún es limitada (41,42).

3 Carcinoma colorrectal pT1

Los programas de cribado poblacional de CCR ha incrementado la detección de CCR con infiltración submucosa (pT1), representando aproximadamente el 25% de todos los CCR diagnosticados en el contexto de programas de cribado. El término de “pólipo maligno” se define como un pólipo endoscópicamente benigno, pero con diagnóstico histológico de adenocarcinoma. La mayoría de los pólipos malignos corresponden a CCR pT1 y se asocian a menor morbilidad y mortalidad. Ante un diagnóstico de CCR pT1 resecado endoscópicamente, debe sopesarse el riesgo de la presencia de metástasis ganglionares, dado que la resección endoscópica es curativa únicamente si no existen metástasis ganglionares. Es conocido que entre el 7% y el 20% de los CCR pT1 presentan metástasis ganglionares (43,44).

3.1. Factores histológicos de riesgo de metástasis ganglionares en el CCR pT1

Varios estudios y metaanálisis han identificado características histológicas de los CCR pT1 que están asociadas con la presencia de metástasis ganglionares, como son la presencia de invasión linfovascular, alto grado histológico, tumor budding (TB) intermedio o alto, poorly differentiated clusters G2 o G3, la profundidad de invasión submucosa y el estado positivo de los márgenes de resección (39).

3.1.1 Invasión vascular

La invasión de vasos pequeños se define como la presencia de tumor dentro de un canal revestido por endotelio sin músculo liso circundante o lámina elástica identificable, y puede representar la invasión de canales linfáticos (Fig. 6), capilares o vénulas post-capilares (45). Normalmente, no se exige diferenciar el tipo de invasión de vasos pequeños de manera rutinaria. Se debe diferenciar la invasión de vasos pequeños del artefacto de retracción. El artefacto de retracción generalmente se observa dentro de la masa tumoral principal, mientras que la invasión linfática suele observarse más alejada de la masa tumoral principal, a menudo en el frente invasivo del tumor (46). En casos difíciles, se pueden utilizar tinciones inmunohistoquímicas para D2-40 o CD31 para ayudar a diferenciar el artefacto de retracción de la verdadera invasión vascular(47,48).

Múltiples estudios han demostrado que la presencia de invasión linfovascular es un predictor independiente de metástasis a los ganglios linfáticos (49–55).

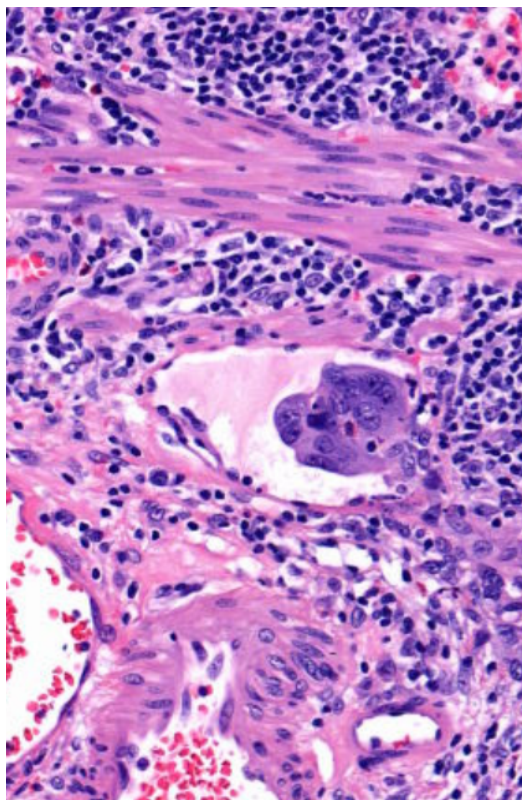


Figura 6: Imagen de invasión linfovascular de adenocarcinoma de colon en la submucosa colónica.

La invasión de vasos sanguíneos grandes o venosos se denomina invasión venosa o sanguínea extramural (Fig. 7) y se define como la presencia de tumor dentro de un canal revestido por endotelio con músculo liso circundante o lámina elástica, y se debe informar por separado de la invasión linfovascular o de vasos sanguíneos de pequeño calibre. Aunque se sabe que la invasión venosa extramural es un factor pronóstico desfavorable y está asociada a metástasis a distancia por vía sanguínea (hepáticas, pulmonares, óseas, etc), la importancia de la invasión venosa intramural es de difícil ponderación (45). Se recomienda que la invasión venosa extramural, más allá de la muscular propia, se informe por separado de la invasión vascular intramural, que suele ser linfática, ya que la

primera es un factor pronóstico adverso y un factor de riesgo independiente para metástasis hepáticas (56).

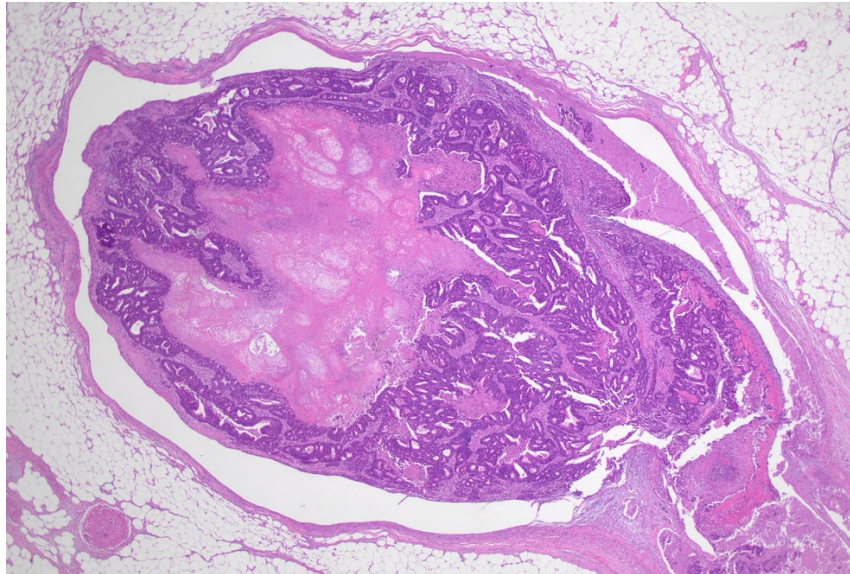


Figura 7: Imagen de una invasión venosa extramural. Observamos un vaso de calibre intermedio-grande con tumor en su interior, localizado en la grasa mesentérica.

3.1.2. Grado histológico

El grado histológico del tumor se considera un factor de riesgo independiente de metástasis ganglionar. El sistema de clasificación del grado para el CCR según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basa en el porcentaje de formación glandular por el tumor. Los adenocarcinomas bien diferenciados exhiben formación glandular en más del 95% del tumor, los adenocarcinomas moderadamente diferenciados en un 50% a 95% del tumor, y los adenocarcinomas poco diferenciados muestran menos del 50% de formación glandular (Fig 8. A y B) (45). Se dividen en alto y bajo grado, incluyendo en bajo

grado los bien y moderadamente diferenciados. Los adenocarcinomas poco diferenciados representan del 5% al 10% de los CCR y se asocian a peor pronóstico (57–60).

Hay que tener en cuenta que el sistema de clasificación mencionado anteriormente solo se aplica al adenocarcinoma convencional. Las variantes histológicas especiales como el carcinoma medular y los adenocarcinomas mucinosos, u otros, no deben clasificarse según estos criterios. Así, los carcinomas medulares tienen un crecimiento sólido con abundante componente inflamatorio linfocitario, suelen presentar inestabilidad de microsatélites y se asocian a mejor pronóstico. Los sistemas de clasificación histológica para los adenocarcinomas mucinosos no se han estandarizado, pero el pronóstico de estos tumores generalmente está relacionado con la cantidad y grado de diferenciación del componente epitelial dentro de los lagos de moco, así como del estado de inestabilidad de microsatélites (45,59,61).

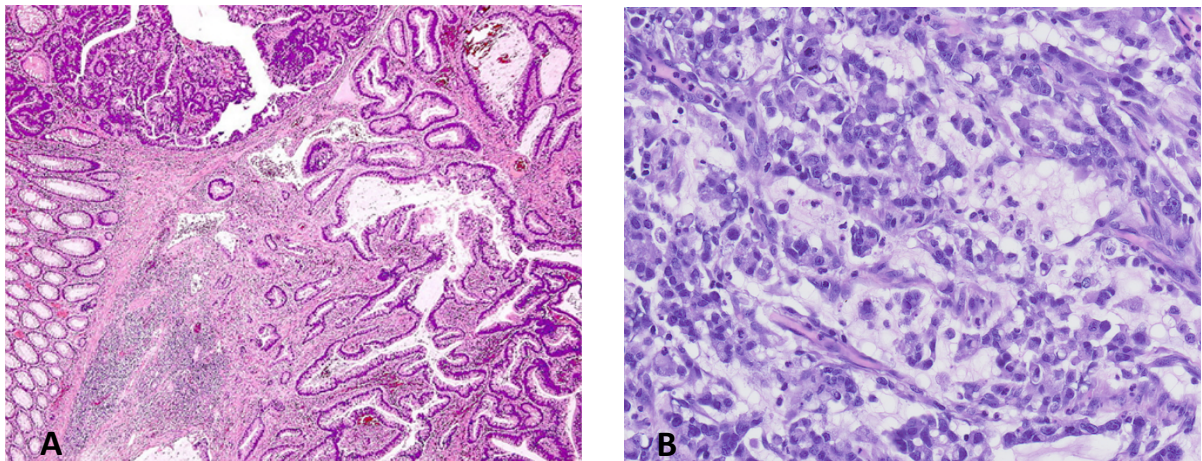


Figura 8: Representación de adenocarcinomas de diferentes grados de diferenciación. (A) bien diferenciado con más del 95% de formación glandular, y (B) pobremente diferenciado sin formación glandular.

3.1.3. Tumor budding

El tumor *budding* (TB) se define como la presencia de células tumorales individuales o en grupos de hasta 4 células en el frente invasivo del tumor (61). El TB es una manifestación de la transición epitelio-mesénquima (EMT), donde las células tumorales realizan una transición a un fenotipo mesenquimal más móvil y con capacidad invasiva. En el CCR el TB es un factor pronóstico importante, sobre todo en estadios iniciales. En los tumores pT1, el TB está significativamente asociado con un mayor riesgo de metástasis ganglionares, y en el estadio II del cáncer de colon se asocia con una peor supervivencia libre de enfermedad (62,64,65). Según las pautas del College of American Pathologists para informes sinópticos sobre los CCR, el TB es un elemento obligatorio para todos los CCR que surgen en pólipos, así como para los casos de cáncer de colon en estadios I y II. En la Conferencia Internacional de Consenso sobre TB se emitió un sistema de puntuación estandarizado e hicieron recomendaciones para informar sobre el TB en el CCR. Según las pautas, el TB debe contarse en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina y no se recomienda hacerlo con tinciones de inmunohistoquímica para citoqueratinas, que pueden utilizarse para contar TB difíciles de identificar debido a la presencia de inflamación o necrosis. El TB se evalúa en el frente invasivo del tumor. Se debe hacer un cribado o escaneo con un objetivo de 10X para identificar la zona del tumor donde haya más número de TB, o campo de "hot-spot", y entonces contar el TB con un objetivo de 20X, en un área de 0.785 mm². La Conferencia Internacional de Consenso sobre TB propuso un sistema de clasificación de tres niveles para informar el TB: Bd1 o budding bajo, de 0 a 4 buds; Bd2 o budding intermedio, de 5 a 9 buds; Bd3 o budding alto, 10 o más buds (Fig. 9 A) (62,65,66). Con este sistema, el budding intermedio a alto se asocia con metástasis ganglionares en CCR pT1, y un TB alto se asocia con un mayor riesgo de recurrencia y mortalidad

en CCR en estadio II (59,64,67,68). Recientemente, se ha descrito una cuarta categoría de TB en los CCR: Bd0. Esta categoría resaltaría los tumores con una ausencia completa de formación de TB tumorales y se ha demostrado que tienen mejor pronóstico que los Bd1 (66).

Se debe tener precaución al evaluar el TB en ciertas variantes histológicas del CCR. En los carcinomas mucinosos y de células en anillo de sello, los grupos de células suspendidos dentro de los lagos de moco no deben contarse como buds tumorales. En el carcinoma medular, la disociación de las células tumorales secundaria a la inflamación puede imitar los buds tumorales, y los *poorly differentiated clusters* (PDC), por lo que no deben contarse en carcinomas micropapilares puros. En casos en los que no se pueda realizar un recuento preciso del TB, el recuento y la clasificación del TB deben informarse como "no se puede evaluar" con una nota que explique la razón. Además, no se debe informar el TB en resecciones de cáncer rectal después de la terapia neoadyuvante, dado que el tratamiento puede haber influenciado en la arquitectura tumoral y no hay datos suficientes sobre su importancia pronóstica (64).

Los TB se describieron como la presencia de TB peritumorales en el frente infiltrante del tumor (PTB). Posteriormente se describieron los TB intratumorales, que son TB localizados en el centro del tumor (ITB). Los ITB son muy útiles en biopsias de carcinoma de recto, pues un ITB alto indica alta agresividad tumoral y estos pacientes se beneficiarían de terapia neoadyuvante, independientemente del estadio T. Hay que considerar que los PTB solo se pueden evaluar en muestras de resección endoscópica o quirúrgica, mientras que ITB se pueden evaluar tanto en biopsias como en muestras de resección de cáncer colorrectal. Tanto ITB como PTB son manifestaciones morfológicas de la transición epitelial-mesenquimal (62).

3.1.4. Poorly differentiated clusters

Los *Poorly Differentiated Clusters* (PDC) se han definido como grupos de ≥ 5 células tumorales en el estroma del frente invasivo o del centro del tumor, que no formen una estructura glandular. Para cuantificar los PDC, primero se explora todo el tumor a pequeño aumento para identificar el área con el mayor número de PDC, incluyendo su borde infiltrativo. Luego, se cuentan los PDC con un objetivo X20 en el área *hot-spot* y se clasifican en tres grados: G1: de 0 a 4; G2 de 5 a 9; G3 ≥ 10 PDC (Fig. 9 B) (68).

En los carcinomas mucinosos se ha propuesto contar los PDC dentro de los lagos de moco (63).

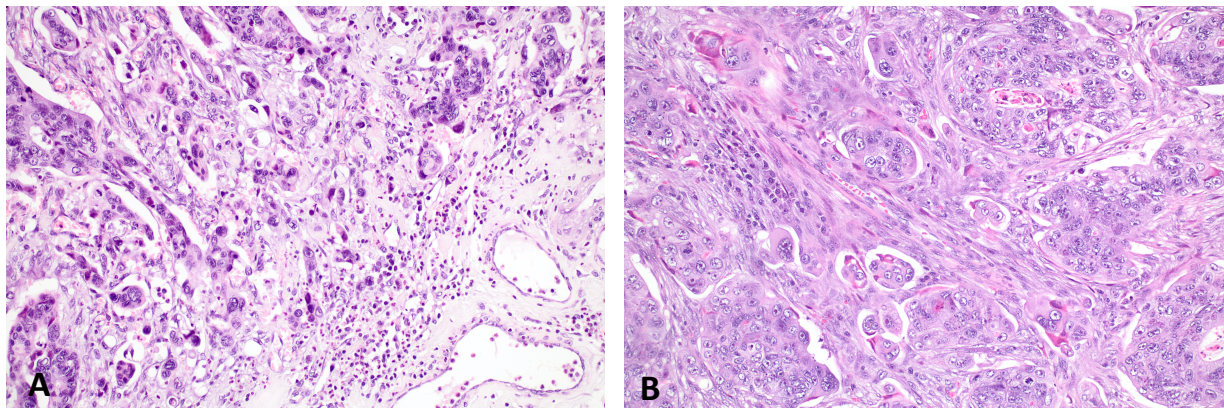


Figura 9: Tumor budding y Poorly Differentiated Clusters: (A) TB alto (Bd3) y (B) y PDC de alto grado (G3).

3.1.5. Profundidad de invasión submucosa

El grosor de la invasión submucosa es uno de los criterios que ha ido variando en los últimos años en cuanto a la importancia y su relación con la presencia de metástasis ganglionares. Es de suma importancia que la medición de esta variable histológica sea consistente y reproducible entre patólogos, por lo que debe haber un consenso de cómo realizar esta medición. Varios autores han propuesto diferentes criterios para evaluar la extensión de la invasión submucosa en CCR pT1. Kikuchi et al. (69) realizaron un estudio utilizando piezas de resección quirúrgica y propusieron un sistema de tres niveles para CCR pT1 sésiles (Fig. 10), definidos como **sm1**= invasión superficial o leve del 1/3 superior de la submucosa de 200 a 300 μ m de profundidad desde la muscularis mucosa; **sm2**= invasión de 2/3 de la submucosa o intermedia y **sm3**= invasión de 3/3 de la submucosa, con el carcinoma cerca de la superficie interna de la muscular propia. En este estudio, la incidencia de metástasis ganglionares fue del 0%, 5% y 25% en sm1, sm2 y sm3, respectivamente, siendo sm3 un factor de riesgo independiente de metástasis ganglionar. Estudios posteriores han respaldado estos hallazgos (70). El problema principal de la clasificación de Kikuchi es que es necesaria la presencia de la muscular propia para poder establecer esta clasificación, por lo que puede realizarse en piezas quirúrgicas, y únicamente en resecciones endoscópicas que incluyan muscular propia.

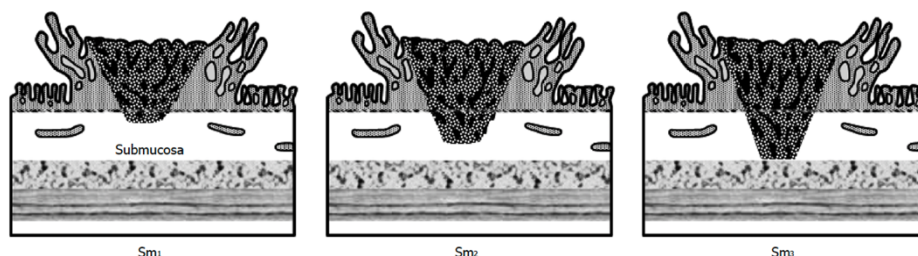


Figura 10: Clasificación de Kikuchi de la invasión submucosa (Sm) de CCR pT1. Adaptado de Aarons et al. (71)

Haggitt et al. (72) propusieron una clasificación para CCR pT1 aplicable a los carcinomas originados sobre pólipos pediculados, de la siguiente manera: **Nivel 0**: carcinoma que infiltra la mucosa, por encima de la muscularis mucosae (carcinoma *in situ*); **Nivel 1**: carcinoma que invade la submucosa a nivel de la cabeza del pólipo; **Nivel 2**: carcinoma que invade la submucosa a nivel del cuello del pólipo; **Nivel 3**: carcinoma que invade la submucosa a nivel del tallo del pólipo; **Nivel 4**: carcinoma que invade la submucosa debajo del tallo del pólipo, pero por encima de la muscular propia. Demostraron que los pacientes con Nivel 4 de Haggitt tenían significativamente más probabilidades de tener metástasis ganglionares o recidivas de la enfermedad. Si se aplica la clasificación de Haggitt a los CCR planos u originados en pólipos sésiles, éstos últimos tendrán un Nivel 4 de Haggitt (Figura 11).

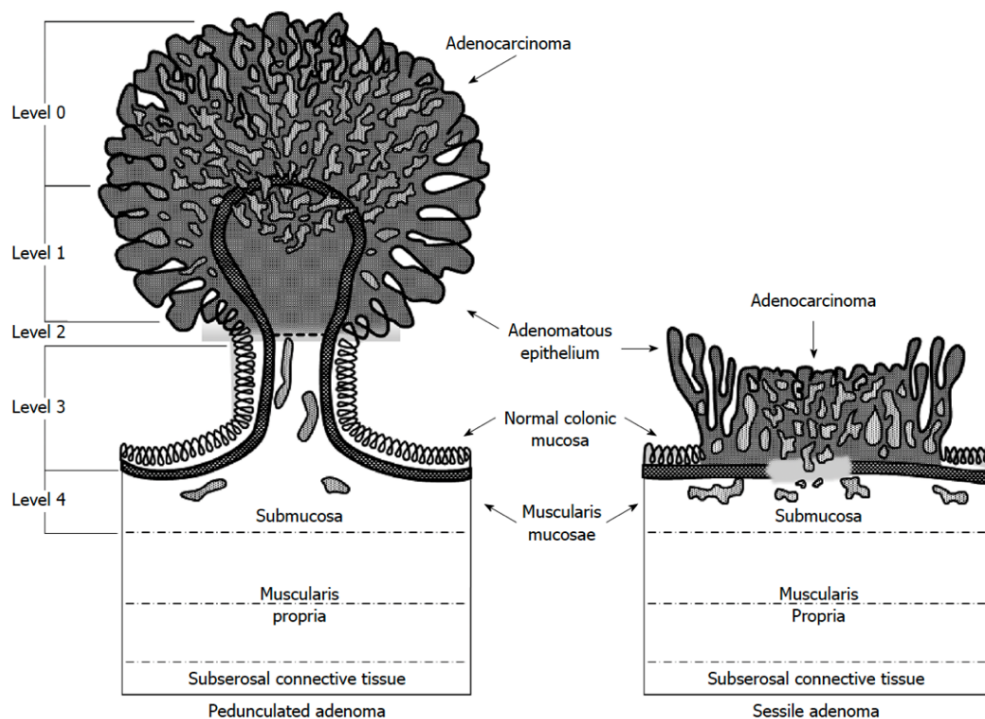


Figura 11: Clasificación de Haggitt de la invasión submucosa en pólipos pediculados y sésiles. Adaptado de Aarons et al. (71)

La profundidad de invasión generalmente se puede obtener fácilmente en muestras correctamente orientadas utilizando un micrómetro o software digital. En los pólipos pediculados, la invasión de la submucosa se mide trazando una línea desde el punto donde cambia la mucosa de colon normal a mucosa con displasia o adenomatosa a cada lado del tallo del pólipo. Esta línea es la línea de Haggitt. La profundidad de invasión será el carcinoma que se encuentre por debajo de esta línea hasta la última célula tumoral visible (Fig. 12).

En los pólipos sésiles, cuando la muscularis mucosa está intacta, o bien es identificable, la invasión de la submucosa se mide desde el nivel inferior de la muscularis mucosa. Cuando la muscularis mucosa está completamente borrada o destruida por el tumor, la invasión de la submucosa se mide desde la superficie del tumor. Históricamente, la invasión submucosa de 1 mm o más se creía que representava un factor importante del riesgo de metástasis ganglionares (riesgo relativo, 5.2; IC del 95%, 1.8–15.4) (59). Sin embargo, un metaanálisis reciente realizado por el grupo de Zwager et al. determina que la invasión submucosa no es un factor de riesgo independiente de metástasis en ganglios linfáticos. Estos resultados desafían la perspectiva temprana y el dogma oncológico de la invasión submucosa como un fuerte indicador para la cirugía oncológica (73).

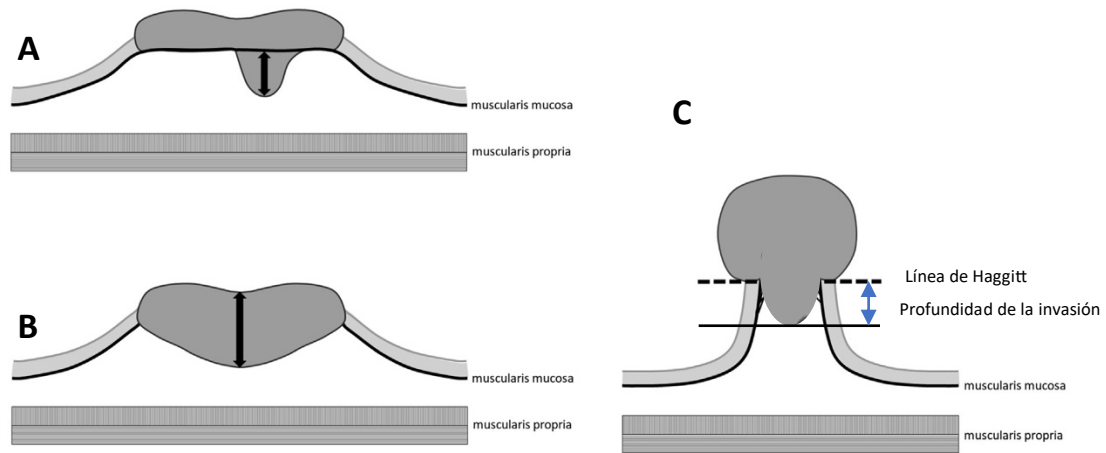


Figura 12: Medición de la profundidad de invasión submucosa en pólipos pediculados y sesiles. A,: Pólipo sésil: Cuando es posible identificar la muscularis mucosa, se mide la profundidad de la invasión de la submucosa desde el borde inferior de la muscularis mucosa. B: Cuando no es posible identificar la muscularis mucosa, la profundidad de invasión de la submucosa se mide desde la superficie del tumor hasta la última célula tumoral en el frente invasivo del tumor. C: Pólipo pediculado: Para lesiones pediculadas, la profundidad de invasión de la submucosa se mide trazando una línea que separa la mucosa normal de la mucosa con displasia (línea de Haggitt), midiéndose la profundidad de invasión desde esta línea hasta la última célula tumoral. Cuando la invasión se limita al interior de la cabeza, por encima de la línea de Haggitt, la profundidad de la invasión de la submucosa es de 0 mm. En pólipos pediculados es conveniente informar además de los mm de infiltración de la submucosa, el nivel de Haggitt. Adaptado de Kajiwara et al. (74)

3.1.6. Márgenes de resección

La evaluación del estado de los márgenes de resección comienza con un examen macroscópico adecuado de la pieza de polipectomía. Para pólipos resecados en bloque, se debe identificar y pintar el margen de resección o el pedículo del pólipo con tinta china negra para su visualización posterior al microscopio. Posteriormente, siempre que sea posible, los pólipos deben seccionarse perpendicularmente al margen de resección o al pedículo, lo que permitirá medir la distancia del carcinoma al margen de resección. Las disecciones endoscópicas submucosas y las resecciones quirúrgicas transanales suelen recibirse fijadas con alfileres en corcho o Porexpan®, con identificación de la orientación por el endoscopista o cirujano. Se debe pintar el margen de resección profundo y los laterales con tinta china. Si se recibe orientado, se puede pintar con distintos colores para identificación de los distintos márgenes. El material, proceda de polipectomías, disecciones submucosas endoscópicas o resecciones quirúrgicas, debe incluirse en su totalidad, (75), lo que permite una evaluación adecuada de la totalidad de la lesión, medición y análisis de todos los factores de riesgo histológicos, así como de los márgenes de resección (40).

Deben informarse tanto los márgenes laterales como el profundo. El estado de los márgenes puede resultar más difícil de evaluar en especímenes recibidos en fragmentos, lo que debe indicarse en el informe patológico (46,76). Se debe informar el estado del margen, positivo o negativo, así como la distancia del tumor al margen más cercano. El verdadero margen de resección se define como el borde libre del tejido conectivo submucoso con artefacto de cauterización (Fig. 13). La presencia de tumor en el margen o a menos de 1 mm del margen de resección es un factor de riesgo para la recidiva del tumor. Como tal, los pacientes con márgenes positivos o cercanos a menudo requieren intervención quirúrgica

adicional (75). Los pacientes con un margen de resección negativo y que carecen de factores histológicos de alto riesgo, tienen un bajo riesgo de metástasis ganglionares y pueden ser manejados adecuadamente con extirpación local, sin necesidad de resección quirúrgica posterior (77).

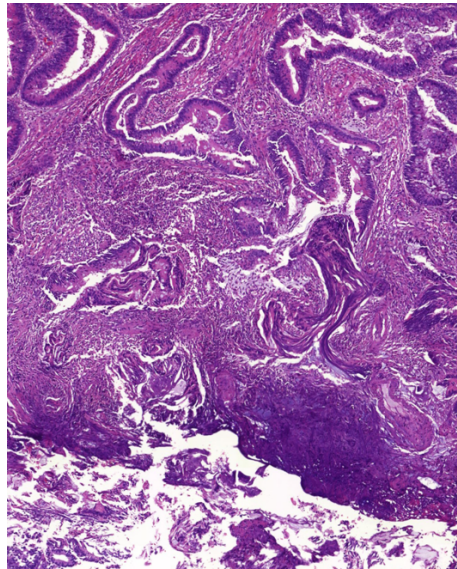


Figura 13: Imagen histológica de un CCR pT1 con margen de resección profundo positivo, con artefacto de cauterio.

3.2. Linfangiogénesis: Un enfoque detallado

Está bien establecido que la metástasis a ganglios linfáticos es el factor pronóstico más importante en el CCR (63–68). Sin embargo, los eventos que inician y regulan la invasión vascular linfática y la subsiguiente metástasis no se comprenden bien. La invasión linfática es un requisito inicial para la metástasis a los ganglios linfáticos, y se ha demostrado en ciertos tumores que las células tumorales con una mayor exposición a la vasculatura linfática tienen tasas más altas de metástasis ganglionares por vía linfática (78,82,84–87). No es

sorprendente que un mayor índice de densidad de vasos linfáticos esté asociado a peor supervivencia en varios tipos de tumores, incluyendo el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, carcinoma de tiroides, carcinoma de mama y melanoma (88–91). Algunos trabajos han demostrado una asociación similar entre una alta densidad de microvasos linfáticos y tasas aumentadas de metástasis en ganglios linfáticos, con peor pronóstico en el CCR (80,92). Estos hallazgos han sido validados en trabajos adicionales en CCR pT1 con una alta densidad de vasos linfáticos, que han mostrado una tendencia similar hacia una mayor incidencia de metástasis en ganglios linfáticos (93–95).

Aunque los vasos linfáticos son generalmente abundantes en la submucosa colónica, los estudios basados en microscopía óptica y electrónica convencional, demuestran la ausencia de vasos linfáticos por encima del nivel de la muscularis mucosae, es decir, en la lámina propia de la mucosa del colon (78,82). La evaluación inicial de los linfáticos en la mucosa del intestino grueso se realizó principalmente mediante secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) y con cortes analizados con microscopía electrónica (96). Sin embargo, la identificación de los linfáticos mediante microscopía óptica convencional y microscopía electrónica no solo fue desafiante, sino también poco fiable. Por ello, en estudios posteriores se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas con el anticuerpo monoclonal D2-40, específico para endotelio de vasos linfáticos, para estudiar la invasión linfática y la densidad de los vasos linfáticos en el carcinoma de colon (92,97,98). La mayoría de los estudios que emplearon estos métodos confirmaron la hipótesis de la ausencia de vasos linfáticos en la lámina propia de la mucosa colónica normal.

No fue hasta un estudio realizado por Fogt et al., en el que utilizaron D2-40 para identificar los vasos linfáticos en la mucosa colónica normal, así como en

adenomas y carcinomas invasivos. Este grupo encontró que, aunque ausentes en la mucosa del colon normal, los vasos linfáticos estaban presentes en la lámina propia de los componentes *in situ* de CCR invasivos, así como asociados con nidos epiteliales invasivos de CCR incipientes (99). Mientras que este último hallazgo está bien establecido, el primero sugiere que los vasos linfáticos pueden estar presentes en la lámina propia del colon en estados anormales distintos al carcinoma invasivo. En concordancia con estos resultados, Kenney et al., tampoco pudieron demostrar la presencia de vasos linfáticos en la lámina propia de la mucosa de colon normal con tinción para D2-40. Sin embargo, demostraron la presencia de vasos linfáticos por encima del nivel de la muscularis mucosae en la mayoría de casos con hallazgos patológicos, ya fueran neoplásicos o inflamatorios (78). Por lo tanto, estos autores demostraron que bajo circunstancias patológicas específicas, la inflamación se asocia con la presencia de vasos linfáticos en la mucosa colónica. En otra serie del grupo de Kaiseling et al. utilizaron la tinción con D2-40 para demostrar que los vasos linfáticos pueden estar presentes en la mucosa colónica en casos de colitis ulcerosa de larga duración, donde hay ensanchamiento de la muscularis mucosae, muscularización de la mucosa, cambios filiformes en la mucosa o hiperplasia del tejido linfoide asociado a la mucosa (100). Más recientemente, Kaneko et al. revelaron que la densidad de vasos linfáticos era proporcional al grado de inflamación asociada en casos de CCR pT1 (95). Es probable que los mediadores inflamatorios induzcan la linfangiogénesis en estos contextos, es decir, pueden desempeñar un papel significativo en la regulación de la proliferación de vasos linfáticos en la lámina propia del colon.

Como ya se ha introducido, la neoplasia induce linfangiogénesis en la mucosa colónica. Además de los hallazgos relacionados con la inflamación, el grupo de Kaiseling et al. encontró en casos de colitis ulcerosa con presencia de

displasia epitelial, una asociación entre cambios epiteliales displásicos e incremento de la cantidad de vasos linfáticos (100). Otros investigadores, Kuroyama et al. utilizaron ensayos histoquímicos con enzimas para identificar vasos linfáticos en casos de CCR y mostraron que los vasos linfáticos intratumorales estaban presentes en el 91% de los CCR, siendo la densidad de vasos linfáticos significativamente mayor dentro del tumor que en la submucosa circundante. También Fogt et al. utilizando D2-40 reportaron la presencia de vasos linfáticos tanto adyacente a nidos de tumor invasivo como en la lámina propia que rodea regiones de carcinoma *in situ* (99). Estos hallazgos implican que en la mucosa colorrectal existe una asociación entre la neoplasia epitelial y la linfangiogénesis. Kenney et al. también demostraron que las condiciones neoplásicas (adenoma y carcinoma *in situ*) estaban asociadas con la presencia de vasos linfáticos en la lámina propia del colon (78).

Cabe destacar que el sistema estadificación del AJCC se basa en el concepto histórico de que los vasos linfáticos están ausentes en la lámina propia del colon. Esto puede ser cierto para el colon normal, pero claramente no es el caso para el carcinoma invasivo, y podría no ser verdad para carcinomas *in situ*. Como ya se ha comentado, y en base a la literatura, los vasos linfáticos son a menudo identificables en la lámina propia de pólipos colónicos y en casos de enfermedad inflamatoria intestinal (83,86,96–98,101,102). Además, el grupo de Fogt et al. observó émbolos tumorales en vasos linfáticos de carcinomas intramucosos (99).

4 Estadificación del Cáncer. TNM

La resección quirúrgica sigue siendo la terapia más efectiva para el CCR localizado, y la mejor estimación del pronóstico se deriva de los hallazgos patológicos en la pieza de resección quirúrgica. El alcance anatómico de la enfermedad, o estadio tumoral, es el factor pronóstico más importante en el CCR, y se calcula con el sistema TNM (Fig. 14).



Figura 14. Estadiaje pT del CCR en función del grado de infiltración. Adaptado de Washington et al. (45).

En la actualidad, el sistema recomendado de estadificación de los tumores es el sistema TNM, desarrollado conjuntamente por el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC). En este sistema, la designación "T" se utiliza para describir la extensión local del tumor, "N" hace referencia al estado de los ganglios linfáticos y "M"

indica la presencia o ausencia de metástasis a distancia (Figura 15). El prefijo "p" se refiere a la clasificación patológica del sistema TNM, que se basa en un examen tanto macroscópico como microscópico de los tejidos afectados. Específicamente, la "pN" se utiliza para indicar que se han obtenido y evaluado los ganglios linfáticos relevantes con el fin de identificar posibles metástasis. Este sistema de clasificación es esencial para proporcionar información precisa sobre el estadio del cáncer, que es el factor pronóstico más importante para el paciente, y para guiar las decisiones de tratamiento, lo que resulta fundamental en el manejo clínico de los pacientes con cáncer. Por otro lado, la clasificación clínica (cTNM) generalmente se realiza utilizando las pruebas de imagen, antes de la cirugía o tratamiento neoadyuvante, durante la evaluación inicial del paciente o cuando no es posible la clasificación patológica.

Estadio	pT	pN	M
I	1-2	0	0
IIA	3	0	0
IIB	4a	0	0
IIC	4b	0	0
IIIA	1-2	1	0
IIIA	1	2a	0
IIIB	3-4a	1	0
IIIB	2-3	2a	0
IIIB	1-2	2b	0
IIIC	4a	2a	0
IIIC	3-4a	2b	0
IIIC	4b	1-2	0
IVA	1-4	0-2	1a
IVB	1-4	0 ó 2	1b
IVC	1-4	0 ó 2	1c

Figura 15. Estadios pronósticos en CCR según la AJCC (103).

4.1 Enfoque en las micrometástasis

Hay que destacar la importancia de la 8ª edición del Manual de Estadificación del Cáncer TNM del Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC, American Joint Committee on Cancer) en relación con las micrometástasis en ganglios linfáticos en pacientes con CCR. Este manual define las micrometástasis como grupos de 10 a 20 células o conglomerados tumorales de al menos 0.2 mm de diámetro, y recomienda considerarlas como ganglios linfáticos positivos. Esta redefinición es especialmente significativa dado que se ha demostrado que los pacientes con micrometástasis ganglionares tienen peor pronóstico e implica que los pacientes con CCR que presenten micrometástasis deben recibir quimioterapia adyuvante, lo que puede mejorar su pronóstico.

Cabe destacar una revisión sistemática con metaanálisis de estudios que evaluaron la importancia pronóstica de la detección de células tumorales en los ganglios linfáticos regionales mediante métodos distintos a la H&E convencional, realizada por Rahbari et al. Mostraron que en pacientes con CRC con ganglios negativos diagnosticados con H&E (pN0), la detección molecular de micrometástasis en los ganglios linfáticos regionales se asociaba con mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad y a peor supervivencias global, libre de enfermedad y asociada a la enfermedad (104)

El Manual de Estadificación del Cáncer también subraya que, según un metaanálisis realizado por Sloothaak y otros investigadores (105), las micrometástasis ganglionares en CCR tienen un valor pronóstico significativo. Esta conclusión ha sido respaldada posteriormente por el mismo grupo de investigadores (106). Lo más sorprendente es que la investigación realizada por el grupo de Yamamoto et al. en el análisis inmunohistoquímico de micrometástasis y células tumorales aisladas (107) tuvo un impacto significativo en la

revisión del sistema de estadificación TNM por parte del AJCC, lo que representa un logro muy destacado en el campo de la oncología.

5 Método One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA). Generalidades

El método OSNA, por sus siglas en inglés One Step Nucleic Acid Amplification (*Sysmex Corporation, Kobe, Japón*) es una técnica de diagnóstico molecular utilizada en el campo de la patología y la oncología para detectar metástasis en los ganglios linfáticos de varios tipos de cáncer, sobre todo en cáncer de mama, pero ha sido validada en otros carcinomas, incluido el CCR. Este método es particularmente valioso para evaluar la presencia de cáncer en los ganglios linfáticos, ya que proporciona resultados rápidos, cuantitativos y precisos, y puede realizarse durante la cirugía, lo que permite a los cirujanos tomar decisiones en tiempo real sobre el procedimiento quirúrgico a realizar en función del resultado obtenido del análisis de los ganglios linfáticos. Es un método semiautomático que se basa en el lisado y homogenización del ganglio linfático seguida de la amplificación y cuantificación en tiempo real del ARN mensajero (ARNm) de citoqueratina 19 (CK19), obteniendo el resultado en 30-40 minutos (108). Un ganglio linfático normal no contiene células epiteliales. El ARNm de la CK19 es un buen marcador para identificar células epiteliales metastásicas procedentes del tumor, como ya se ha demostrado en el cáncer de mama, colon, estómago o tiroides (98–101).

El método OSNA se realiza de forma rápida y automatizada, es altamente específico y garantiza la ausencia de contaminación por ADN genómico. Este proceso se realiza en un equipo RD-100i (Sysmex Corp, Japan) con el uso de los reactivos LYNOAMP® y LYNORHAG®. Utiliza una técnica de amplificación

innovadora llamada RT-LAMP (Amplificación Isotérmica en Mediada por Bucle), que tiene las siguientes características clave:

1. Transcribe el ARN mensajero y amplifica el ADN complementario (cADN) sin necesidad de pasos adicionales de purificación.
2. La amplificación es isotérmica, a una temperatura constante de 65°C.
3. Cada muestra se amplifica en 11 minutos.
4. Utiliza seis primers diferentes para asegurar alta especificidad.
5. Permite la detección en tiempo real.

Los resultados del método OSNA son cuantitativos. Así, ofrece una forma más precisa de determinar el estado de los ganglios linfáticos al introducir una nueva métrica llamada Carga Tumoral Total (CTT). La CTT representa la suma de todas las copias de ARNm CK19 contenidas en todos los ganglios linfáticos analizados mediante OSNA. La CTT proporciona un valor cuantitativo continuo que representa la cantidad de tumor presente en el compartimento ganglionar, lo que ha demostrado ser un indicador pronóstico valioso por ejemplo en pacientes con CCR o cáncer de mama (113,114). Esto permite una evaluación más precisa del riesgo de recurrencia de los pacientes y permite un tratamiento personalizado adecuado.

El resultado molecular cuantitativo obtenido está directamente relacionado con la cantidad de células tumorales metastáticas presentes en los ganglios linfáticos. En los primeros estudios de validación de la técnica en CCR y cáncer de mama se establecieron cuatro puntos de corte que en la actualidad ya no se utilizan en la práctica diaria para el manejo terapéutico de los pacientes:

- Negativo absoluto (<100 copias/microlitro)
- Células tumorales aisladas (entre 100 y 250 copias/microlitro)
- Micrometástasis (entre >250 copias y 5000 copias/microlitro)
- Macrometástasis (>5000 copias/microlitro)

El método OSNA tiene aprobada la indicación de uso para el diagnóstico de metástasis ganglionares en cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer gástrico. En el caso del cáncer de mama la implementación rutinaria del método OSNA para el diagnóstico de metástasis ganglionares es una realidad, especialmente en el continente europeo, incluso en algunas guías clínicas de Anatomía Patológica -como la del Reino Unido o el libro blanco de la de la SEAP- lo han incluido en sus protocolos de manejo y recomiendan su uso asistencial (113,115).

5.1. Método OSNA en Cáncer de Mama

La técnica OSNA fue inicialmente aplicada en el ámbito del manejo intraoperatorio del cáncer de mama, específicamente en la evaluación de los ganglios linfáticos centinela (GLC) (116–119). Los primeros estudios se enfocaron en la capacidad del método OSNA para detectar patología neoplásica en GLC axilares en cáncer de mama. Estos estudios compararon la técnica con análisis histológicos e inmunohistoquímicos exhaustivos, logrando concordancias superiores al 90% (115–119).

Investigaciones posteriores se centraron en evaluar el potencial de la técnica OSNA en GLC axilares para predecir la presencia de metástasis axilares adicionales en ganglios linfáticos no centinela (114,115,119). Se destacó la utilidad de la capacidad cuantitativa de la técnica OSNA, y se observaron tasas de

afectación en GLC no axilares relacionadas con los resultados OSNA. La detección de micrometástasis llevó a un riesgo de metástasis en ganglios no centinela del 10-20%, mientras que la presencia de macrometástasis aumentó el riesgo al 35-55% (116–118,120,121)

Otros estudios se enfocaron en evaluar el poder predictivo de la CTT en GLC (114,115,119). Se observó que la CTT de los GLC podía determinar la probabilidad de metástasis axilares adicionales, con un punto de corte estimado de 15.000 copias de ARNm de CK19/ μ L por caso en uno de los estudios (133). Sin embargo, análisis adicionales revelaron la complejidad de la situación, ya que el valor predictivo de la técnica OSNA y la CTT estaba influenciado por factores histológicos y clínicos adicionales. Un estudio mostró que la CTT de más de 1.2×10^5 copias/ μ L en GLC axilares presentaba un valor predictivo negativo del 80% para la presencia de metástasis axilares adicionales, pero este valor variaba al evaluar subgrupos según receptores hormonales positivos (115).

Para profundizar en las evaluaciones, algunos grupos presentaron un nomograma que intenta predecir el riesgo de metástasis ganglionares adicionales (140). Este nomograma incluye no solo el valor de la CTT, sino también otros factores estadísticamente significativos para predecir la presencia de metástasis ganglionares axilares, como la invasión linfovascular, el número de GLC afectados, el estado de Her2 y el tamaño tumoral (119).

5.2. Método OSNA en Cáncer Colorrectal

Aproximadamente un 20-25% de los pacientes con CCR en estadio I y II, (pT1-4 N0), sin afectación de ganglios linfáticos sufrirán una recurrencia de la

enfermedad en un plazo de 5 años (122–124). Este fenómeno se explica en parte por la presencia de metástasis ganglionares de pequeño tamaño, que no se detectan mediante el análisis histopatológico convencional. En la mayoría de los casos, se realiza solo un nivel de tinción con H&E para evaluar los ganglios linfáticos en pacientes con CCR. Sin embargo, este enfoque analiza solo una parte muy pequeña y arbitrariamente seleccionada de la totalidad del ganglio linfático, lo que hace inevitable la omisión de micrometástasis. La baja sensibilidad de la tinción con H&E para la detección de micrometástasis en ganglios linfáticos en pacientes con CCR es bien conocida. La falta de un método de detección altamente sensible de metástasis en ganglios linfáticos sigue siendo un problema preocupante para el manejo del CCR en estadios precoces, y especialmente para el oncólogo, ya que los pacientes se infraestadifican y no se benefician de quimioterapia adyuvante, por lo que tienen mayor riesgo de recurrencias locales y a distancia, así como una peor supervivencia.

La baja sensibilidad de la H&E para el estadiaje ganglionar (pN) en el CCR se ha intentado mejorar realizando cortes seriados de los ganglios, añadiendo tinciones de inmunohistoquímica para citoqueratinas, o utilizando métodos moleculares costosos. Hasta la fecha, el método OSNA es el método validado más sensible para obtener un estadiaje ganglionar real en CCR en estadios I y II, habiendo numerosos estudios que lo demuestran (108,109,113,125–131)

5.2.1. Disección de ganglios linfáticos en fresco en el CCR y diagnóstico del estadio pN con extensiones citológicas

El primer paso para el análisis de los ganglios linfáticos con el método OSNA es la disección de los mismos en fresco. Para ello, se debe preparar el lugar de trabajo y el material antes de recibir la pieza quirúrgica. Se necesitarán los

siguientes materiales: mascarilla, bata y gorro quirúrgico, hielo picado, placa de aluminio, papel de filtro limpio, guantes estériles sin polvo, pinzas y hojas de bisturí estériles, portaobjetos pretratados, tubos de PCR, casetes y báscula de precisión.

Se debe iniciar la disección de los ganglios linfáticos antes de 60 minutos tras la extracción de la pieza por parte de los cirujanos. Esta celeridad es importante para evitar la degradación excesiva del mRNA. Por ello, debe crearse un circuito rápido de llegada de la pieza quirúrgica al servicio de Anatomía Patológica. Existe la posibilidad de que no se pueda iniciar la disección ganglionar pasados esos 30-60 minutos tras la extracción, en ese caso, se podría guardar la pieza en la nevera a -4°C durante un máximo de 2 horas y evitaría que se degrade el mRNA.

Debe prepararse la mesa de trabajo, extendiendo el hielo en la base y poniendo encima una placa metálica. Se pone papel de filtro limpio encima de la placa metálica y se coloca en la superficie la pieza quirúrgica. Se separa el mesocolon o mesorrecto con ayuda de un bisturí y pinzas estériles. Se debe procurar no perforar la pared del colon o recto con el bisturí, esquivar las zonas de infiltración del tumor en el tejido adiposo o la presencia de divertículos. En caso de que el tumor infiltre la grasa, se aconseja no disecar la misma en la zona del tumor y dejar un margen de 1 cm, disecando grasa libre.

Una vez disecado el tejido adiposo, se limpia con agua del grifo para eliminar la sangre. Se cambia el papel de filtro por uno limpio y la hoja de bisturí. Seguidamente, se procede a la búsqueda de ganglios linfáticos separando y cortando la grasa con la ayuda del bisturí. En ningún caso se deben intentar disecar los ganglios de forma manual y no se debe tocar la grasa con los guantes.

Cuando se identifica un ganglio linfático, se realizará una sección central o hemisección y se efectuará una extensión circular de la superficie resultante a la hemisección, en un portaobjetos pretratado con el fin de obtener una extensión monocapa de células. Después se introducirá la mitad del ganglio en un tubo de PCR. La otra mitad del ganglio se evaluará de forma convencional por H&E. Se repetirá el procedimiento con cada ganglio linfático disecado. Se introducirán varios ganglios (mitades) en un mismo tubo de PCR usando el método pooling diseñado por nuestro grupo, que consiste en el análisis de múltiples ganglios linfáticos en un mismo tubo de PCR, hasta un peso de 600 mg, que es el límite de peso por tubo en el sistema OSNA (126). Al finalizar la disección ganglionar, los tubos de PCR que contienen los ganglios deben almacenarse en un congelador a -80°C hasta la realización de la técnica OSNA.

El objetivo de realizar la extensión citológica es poder realizar el análisis morfológico, dado que una parte del ganglio se destina a OSNA y el resto para H&E. Se realizarán extensiones de tres o seis ganglios por portaobjetos. Los portaobjetos se secarán al aire y se llevará a cabo una técnica inmunohistoquímica para CK19 de las extensiones, sin realizar pretratamiento previo. De esta forma, con las extensiones podremos dar el valor pN, y compararlo con el valor pN obtenido con H&E.

Tras la disección en fresco de los ganglios linfáticos, la pieza quirúrgica y la grasa restante se fijará en formol durante 24 horas. Tras ello, se hará una búsqueda adicional de ganglios linfáticos residuales que puedan quedar en la grasa. Los ganglios residuales que se identifiquen se estudiarán por el método histológico convencional (un corte central, teñido con H&E). El estudio del tumor se realiza siguiendo los protocolos actualizados del Colegio Americano de Patología (<http://www.cap.org>).

Hipótesis

Hipótesis

La hipótesis de la presente tesis doctoral se basa en que la utilización del método OSNA para el análisis de ganglios linfáticos en etapas muy tempranas de carcinomas colorrectales, pTis y pT1, proporcionará información crucial sobre la cantidad de celularidad tumoral presente en los ganglios linfáticos que drenan el tumor, ya sean células tumorales aisladas, micro o macrometástasis, lo que permitirá una evaluación más precisa del estado ganglionar real en estos pacientes.

Además, se plantea que la presencia de celularidad tumoral en los ganglios linfáticos de los carcinomas *in situ* proviene de la presencia de vasos linfáticos en la lámina propia de estos tumores, un factor histológico previamente no investigado. Por ello, la presencia y cuantificación de los vasos linfáticos en la lámina propia los CCR pTis podría contribuir significativamente a los resultados obtenidos.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es llevar a cabo una evaluación exhaustiva de la técnica de estadificación ganglionar utilizando el método OSNA en pacientes con carcinomas colorrectales en estadios muy tempranos, pTis y pT1. La importancia de esta investigación radica en su potencial para influir en la práctica clínica y el pronóstico de estos pacientes en el futuro, permitiendo una atención médica y un tratamiento más personalizados.

Para alcanzar este objetivo general, se han definido los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un análisis detallado de las cargas tumorales totales en los ganglios linfáticos de pacientes con carcinoma colorrectal en estadios pTis y pT1 utilizando el método OSNA. Esta etapa permitirá comprender la extensión y la presencia de células tumorales en los ganglios de manera precisa.
2. Determinar el significado patológico de las cargas tumorales detectadas y establecer relaciones entre estos resultados y la presencia y cantidad de vasos linfáticos en la lámina propia, utilizando el marcador inmunohistoquímico D2-40.
3. Explorar la correlación con factores clínico-patológicos relevantes en el CCR con el fin de obtener información que permita mejorar la toma de decisiones clínicas y el manejo terapéutico de los pacientes con CCR in situ y pT1.

Material, métodos y resultados

Material, métodos y resultados

Primer estudio

Tumour Cell Seeding to Lymph Nodes from In Situ Colorectal Cancer

Maria Teresa Rodrigo-Calvo, Karmele Saez de Gordo, Sandra Lopez-Prades,

Ivan Archilla, Alba Diaz, Mario Berrios, Jordi Camps, Eva Musulen, Miriam

Cuatrecasas

Cancers (Basel). 2023 Jan 30;15(3):842

Resumen:

El estudio se centra en la búsqueda de vasos linfáticos (VL) en la lámina propia de CCR *in situ* resecados quirúrgicamente, así como en la detección de la presencia de carga tumoral en los GLs regionales. Los resultados arrojan información importante relacionada con el pronóstico de los pacientes. Se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas (D2-40) para identificar la presencia de VL en la mucosa de los tumores. Además, se analizaron los GLs mediante histología (H&E) y método molecular OSNA basado en RT-PCR. Todos los casos se clasificaron inicialmente como pN0 con H&E. Sin embargo, el estudio molecular reveló la presencia de una baja cantidad de carga tumoral en los GLs en un subgrupo de casos (28%), aunque sin consecuencias clínicas. Estos resultados sugieren que, aunque el CCR *in situ* generalmente se considera de bajo riesgo de metástasis ganglionares, la detección de carga tumoral en los ganglios linfáticos mediante técnicas moleculares puede tener valor en la estratificación del riesgo y en la toma de decisiones clínicas. En resumen, este estudio proporciona evidencia de que incluso en casos de CCR pTis, puede haber carga tumoral en los GLs. Aunque esto no se tradujo en consecuencias clínicas a corto plazo en el grupo de pacientes estudiados, este hallazgo podría ser útil para mejorar la estratificación del riesgo y el manejo clínico de estos pacientes.

Article

Tumour Cell Seeding to Lymph Nodes from In Situ Colorectal Cancer

Maria Teresa Rodrigo-Calvo ^{1,2} , Karme Saez de Gordo ^{1,2} , Sandra Lopez-Prades ^{1,2} , Ivan Archilla ^{1,2} , Alba Diaz ^{1,2,3,4} , Mario Berrios ⁵, Jordi Camps ^{2,3,6,7} , Eva Musulen ^{8,9,*}  and Miriam Cuatrecasas ^{1,2,3,4,*} 

- ¹ Pathology Department, Centre of Biomedical Diagnosis (CDB), Hospital Clinic, 08036 Barcelona, Spain
- ² Molecular Pathology of Inflammatory Conditions and Solid Tumours Research Group, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain
- ³ Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 28029 Madrid, Spain
- ⁴ Department of Basic Clinical Practice, University of Barcelona (UB), 08036 Barcelona, Spain
- ⁵ Pathology Department, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain
- ⁶ Gastroenterology Department, Hospital Clinic, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- ⁷ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, University Autonomous of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain
- ⁸ Pathology Department, Hospital Universitari General de Catalunya-Grupo QuironSalud, Sant Cugat del Vallès, 08195 Barcelona, Spain
- ⁹ Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Badalona, 08916 Barcelona, Spain
- * Correspondence: eva.musulen@quironsalud.es (E.M.); mcutatrec@clinic.cat (M.C.); Tel.: +34-935047940 (E.M.); +34-932275536 (M.C.)



Citation: Rodrigo-Calvo, M.T.; Saez de Gordo, K.; Lopez-Prades, S.; Archilla, I.; Diaz, A.; Berrios, M.; Camps, J.; Musulen, E.; Cuatrecasas, M. Tumour Cell Seeding to Lymph Nodes from In Situ Colorectal Cancer. *Cancers* **2023**, *15*, 842. <https://doi.org/10.3390/cancers15030842>

Academic Editor: Tsuyoshi Sugiura

Received: 4 January 2023
Revised: 25 January 2023
Accepted: 27 January 2023
Published: 30 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Lymph node (LN) metastasis is an important prognostic factor in colorectal cancer (CRC). We aimed to search for lymphatic vessels (LVs) in the lamina propria of 39 surgically resected in situ CRC, as well as to detect the presence of tumour burden in the regional LNs. We identified the presence of LVs in the mucosa of all tumours (39/39; 100%) using D240 immunostains. LNs were analysed by both H&E and a RT-PCR-based molecular method. All cases were pN0 with H&E, and the molecular assay detected the presence of low amounts of tumour burden in the LNs of 11/39 (28%) cases, with no clinical consequences at 1 to 5 years of follow-up. The amount of tumour burden in LNs has proven to be a prognostic factor. Despite the fact that pTis is considered to have little or no risk of LN metastasis, our results enabled to quantify the amount of tumour burden within LNs, which may help clinical management.

Abstract: Lymph node (LN) metastasis is an important prognostic factor in colorectal cancer (CRC). We aimed to demonstrate the presence of lymphatic vessels (LV) in the mucosa of in-situ (pTis) CRC, and of detectable tumour burden in regional LNs. This is an observational retrospective study of 39 surgically resected in situ CRCs. The number of LVs was evaluated in both pTis and normal mucosa using D2-40 immunostains. All LNs were assessed with both H&E and the One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) assay, and the results were correlated with clinicopathological features. D2-40 immunohistochemistry revealed LVs in the lamina propria of all pTis CRC (100%), being absent in normal mucosa. A median of 16 LNs were freshly dissected per patient, and all cases were pN0 with H&E. Molecular LN analysis with OSNA revealed the presence of low amounts of tumour burden in 11/39 (28%) cases (range 400 to 4270 CK19 mRNA copies/ μ L), which had no clinical consequences. This study demonstrates the presence of LVs in the lamina propria in 100% of pTis CRC, as well as the presence of low amounts of tumour burden in regional LNs, only detected by molecular methods. Given the prognostic value of LN tumour burden, its molecular quantification may help a patient's clinical management.

Keywords: in situ colorectal cancer; lymph node; staging; diagnosis; OSNA

1. Introduction

It has long been established that in situ colorectal carcinoma (CRC) has scant capacity for lymph node (LN) metastasis, which is supported by the hypothesis that the normal colonic mucosa is devoid of lymphatic vessels (LV) [1,2]. In addition, one of the most important prognostic factors in CRC is the presence of LN metastasis. Nevertheless, in early stages of CRC, the presence of LN micrometastases may be difficult to detect by standard hematoxylin and eosin (H&E) analysis, which has caused researchers to seek for more sensitive methods of LN analysis [3].

The colonic mucosa has abundant capillary vessels in the lamina propria, ensuring a rich blood supply. Its lymphatic drainage is indirectly observed by the large number of LV in the submucosa. Nevertheless, LVs are not seen in normal colorectal mucosa. Fogt et al. used D2-40 immunohistochemistry (IHC) to seek for the presence of LV in the normal colonic mucosa, adenomas, and invasive carcinomas. They found that LVs were absent in normal colon mucosa, but present in the lamina propria of in situ and invasive carcinomas [1]. The same observations were validated by other authors [2,4]. However, other studies have shown that there are pathological conditions, including neoplasms and inflammation, in which an induction of lymphatic angiogenesis occurs [5], with presence of LV in the lamina propria of the colorectal mucosa. All these studies demonstrate that LV may be present in the lamina propria of the colon in abnormal conditions other than frankly invasive carcinomas [1,2,5,6].

The One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) is an RT-PCR-based molecular assay for cytokeratin 19 (CK19) mRNA detection. It is a quantitative and highly sensitive method, useful for the diagnosis of LNs metastases and quantification of the amount of tumour burden in the LN compartment. This method of LN assessment has been validated for the analysis of sentinel LNs from breast carcinoma, as well as for LN staging in CRC [7,8]. In the later, it has been proven to be more accurate than conventional H&E for LN staging, and to have prognostic implications in early stages of CRC [9–11].

The purpose of our study was to demonstrate the presence of LVs in the colorectal mucosa of in situ CRC, and to determine both the capability of tumour cell seeding into regional LNs, and the ability to detect and quantify the amount of tumour burden within regional LNs.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Tumours

This is a retrospective and observational study from a single institution for molecular identification of LN metastases. From May 2012 to October 2018, we included 312 stage I to III CRC patients submitted to surgery after a diagnosis of carcinoma or unresectable adenoma, in the context of population-based CRC screening program using the fecal immunochemical occult blood test (FIT) (OC-Sensor®, Eiken, Japan). Among all patients included, we selected all pTis CRC. LN analysis from the resected specimens was performed with both H&E and OSNA.

Recruited cases were from patients with primary surgery for an endoscopically unresectable adenoma which resulted in a pTis CRC. All pTis tumours were entirely submitted for histological examination and step sections were performed to ensure the absence of submucosal infiltration. All tumours invaded only the lamina propria, and none invaded either partially or totally the muscularis mucosae. Thus, although our tumours were in situ carcinomas according to the AJCC and the College of American Pathologists definition of pTis, i.e., “tumours involving the lamina propria and/or muscularis mucosae, but not extending through it (intramucosal carcinoma)” [12,13], none of our cases reached the muscularis mucosae. Inclusion criteria were patients older than 18 years-old with tumour positivity for CK 19 IHC. Exclusion criteria were CRC with pT stage higher than pTis, metastatic carcinomas, presence of other neoplasms, familial adenomatous polyposis, synchronous tumours, or chronic inflammatory bowel disease.

2.2. Ethical Considerations

The study was approved by the Ethics and Scientific Committee of our institution (Ref. HCB 2012/7324). All patients signed and kept a copy of the informed consent document for participation in the study after the nature of the research was fully explained. Another copy was kept with the patient's clinical files, and a third copy was kept in the Biobank files of our institution.

2.3. Immunohistochemistry Staining

Immunohistochemical staining with CK19 (A53-B/A2, ref 760-4281, Roche, Basel, Switzerland), CAM5.2 (ref 790-4555, Roche, Basel, Switzerland), and podoplanin (D2-40) (D2-40, ref 760-4395, Roche, Basel, Switzerland) antibodies was performed with the Ventana Benchmark Ultra (Roche, Basel, Switzerland) on 2-micron tissue sections placed on FLEX IHC microscope slides, according to the manufacturer's protocol, with 20 min incubation for each primary antibody [14]. Immunostains for CK19 and D2-40 were performed in both normal mucosa and pTis from all cases. Positivity for CK19 was defined as membranous staining of more than 10% of tumour cells. D2-40 membrane or cytoplasm positivity was located on the lymphatic endothelial cells. CAM5.2 was performed in all pTis to evaluate the intratumour tumour budding, and for an enhanced identification of tumour cells within the LVs.

2.4. Lymphatic Vessel Assessment

We assessed the presence and density of LVs in both tumours and normal mucosa on the D2-40-stained slides. All pTis slides were first scanned at low power with an optical microscope (Olympus BX41, Olympus, Japan) to find the area of the tumour with the highest density of LVs. Then, an LV count was performed using the 20× objective lens, corresponding to an area of 0.785 mm² [5,15,16]. Only LVs located in the lamina propria were counted, excluding LV in contact with the superficial part of the muscularis mucosae, which are known to be present in normal colon mucosa.

2.5. Intratumour Budding Evaluation

We counted the number of intratumour tumour buds (ITB) present in the lamina propria of pTis with cytokeratin immunostains, using the classification of the International Tumour Budding Consensus Conference (ITBCC), i.e., low TB (Bd1, from 0 to 4 buds), intermediate TB (Bd2, 5 to 9 buds), and high TB (Bd3, ≥10 buds) [17]. We furthermore included the recently described Bd0 category when there was a complete absence of tumour buds, redefining Bd1 as 1 to 4 buds [18].

2.6. Lymph Node Dissection and Analysis

LN from pericolic and intermediate levels (D1 and D2) of pTis CRC were freshly dissected within 45 min after surgical resection, and were not separated into stations. Fresh dissection was performed as described by Rakislova et al. [19]. Briefly, the mesocolon or mesorectum was separated from the colorectal wall using sterile scalpel and forceps. Fresh LNs were isolated and cut in half. One half of the LN was put into a PCR tube for OSNA analysis using the pooling protocol [19]. The other half was used for conventional pN stage with H&E and processed with formalin fixation and paraffin embedding (FFPE).

2.7. One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Assay

The OSNA assay is a PCR-based quantitative amplification of CK19 mRNA. It uses the RT-LAMP (Real-Time Loop Mediated Isothermal Amplification) at 65 °C without previous purification steps. It is a fast and standardized method used for routine sentinel LN analysis in breast carcinoma, which has also been validated for CRC LN staging [7–9]. The results are given as the total tumour load (TTL), defined as the total amount of CK19 copies/μL present within all the LNs from a given surgical specimen [20]. The TTL represents the amount of tumour present in all the LNs analyzed from one surgical specimen. An OSNA

result of ≥ 250 copies/ μ L was considered positive. Confirmation that the primary tumour was positive for CK19 immunohistochemistry was necessary to guarantee a negative OSNA result.

2.8. Lymph Node Staging

In all patients, pathological LN diagnosis (pN stage) was performed using conventional H&E analysis, according to the American College of Pathology/TNM-UICC protocols [13] (https://documents.cap.org/protocols/ColoRectal.Bx_4.2.0.1.REL_CAPCP.pdf, accessed on 26 January 2023). Both pathologists and surgeons were blinded to the molecular OSNA results, which did not interfere with the patient's clinical management.

2.9. Statistical Analysis

The χ^2 test was used to analyze the association between qualitative variables, followed by Fisher's exact test and Student's *t*-test, or by the Mann-Whitney test for quantitative variables. A $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Study Sample

Thirty-nine in situ CRC surgical specimens were included in the study from May 2012 to October 2018. None of the cases had had a previous endoscopic resection. The mean age of the patients was 68.6 years-old (range 56–89) and 59% were males. Tumours ranged in size from 0.4 to 5.5 cm. Tumours ≥ 2 cm were arbitrarily defined as big. All tumours were low grade and most (31/39; 79%) were on the right colon. The CK19 immunostain resulted in positives in all pTis CRC. Patients did not receive adjuvant therapy and were alive without disease between 1 and 5 years of follow-up. Clinical and pathological characteristics of all cases are described in Table 1.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of in situ colorectal carcinomas.

Category	No (Total)	No (%)
Gender		
Male	23	59
Female	16	41
Age (year)		
<65	17	44
≥ 65	22	56
Tumour size (cm)		
<2	23	59
≥ 2	16	41
Tumour location		
Right colon	31	79
Left colon and rectum	8	21
Lymphatic vessels		
Low LV	25	64
High LV	14	36
Tumour budding		
TB-negative (Bd0)	30	77
TB-positive (Bd1, Bd2)	9	23
OSNA		
Positive	11	28
Negative	28	72
LN		
Fresh	556	86
Formol	92	14

LV (lymphatic vessels), TB (Tumour budding), OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification), LN (lymph node).

3.2. The Normal Colonic Mucosa Is Devoid of Lymphatic Vessels

D2-40 immunohistochemistry performed on normal colorectal mucosa demonstrated the absence of LVs in the lamina propria in all cases, but presence next to the muscle fibers of the superficial part of the muscularis mucosae, without reaching the base of the crypts. Abundant LVs were present in the submucosa (Figure 1a).

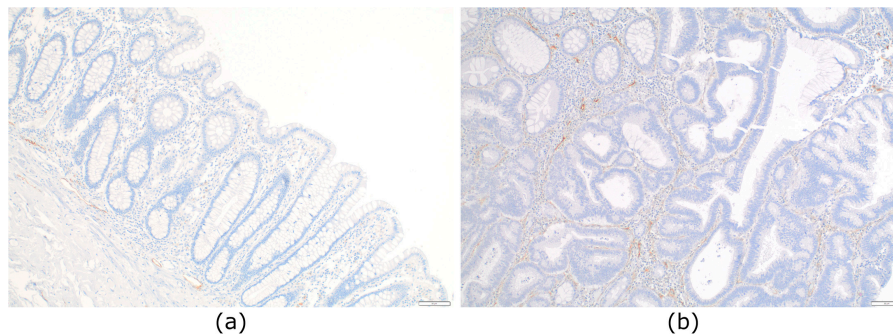


Figure 1. Distribution of lymphatic vessels in normal colon mucosa and in situ colorectal carcinoma: (a) Normal colonic mucosa devoid of lymphatic vessels in the lamina propria. Lymphatic vessels are seen just above the muscularis mucosae and in the submucosa (D2-40, $\times 100$); (b) lymphatic vessels present in the lamina propria of a pTis colorectal carcinoma (D2-40, $\times 100$).

3.3. Presence of Lymphatic Vessels in the Mucosa of In Situ CRC

When assessing the presence of LVs of in situ CRC using D2-40 IHC, we observed LVs in the lamina propria of all tumours (39/39; 100%). We next quantified the number of LVs present in each tumour, which ranged from 1 to 7. We arbitrarily defined two groups: low-LV density when containing 0–4 LVs and high-LV density when containing 5–7 LVs (Figure 1b). We only counted the intratumoural LVs. The density of LVs was not significantly different depending on location, gender, or size (Table 2). We did not identify any tumour cell inside LVs with CK stains (CAM5.2 or CK19).

3.4. Intratumoural Tumour Budding in pTis

Intratumoural tumour budding (ITB) was assessed with CK CAM 5.2. We divided ITB into two groups, ITB-negative (Bd0) and ITB-positive (Bd1 and Bd2). Most cases, 76.9% (30/39) had no tumour buds and were classified as Bd0. Nine cases (23.1%) were listed as ITB-positive (Figure 2), seven had Bd1, and two had Bd2. We did not find any differences between the OSNA results and tumour budding, nor with the number of LVs ($p = 0.217$ and $p = 0.923$, respectively).

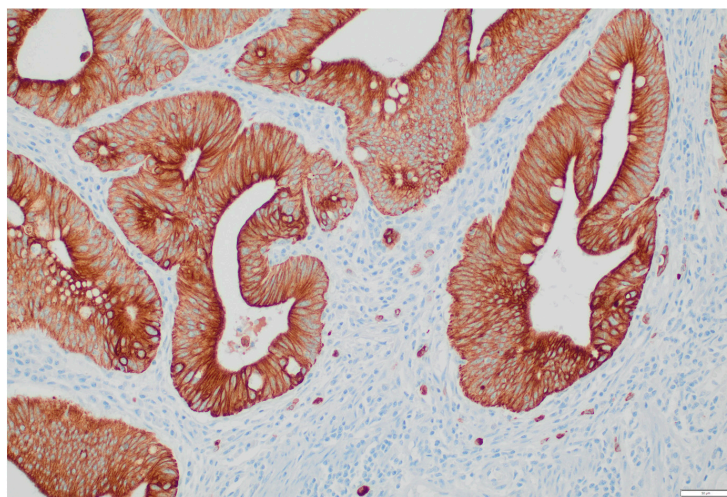
3.5. Detection of Tumour Burden in Regional LNs with the OSNA Assay

A total of 648 LNs were dissected from 39 cases, with a mean of 16.6 LNs per patient. 556 LNs were freshly dissected and 92 (14.1%) were found post formalin fixation. Fresh LNs were analyzed by both H&E and the OSNA assay. All patients were pN0 by H&E. OSNA detected the presence of tumour burden in the LNs of 11/39 (28%) cases, with low TTLs (range 400 to 4270 CK19 mRNA copies/ μ L). There was no significant correlation of OSNA positive cases with age, sex, location, and LV density (Table 3).

Table 2. Clinicopathologic characteristics of pTis colorectal carcinomas according to lymphatic vessel density.

Category	High-LV (Number)	Low-LV (Number)	<i>p</i>
Gender			
Male	2	21	0.538
Female	3	13	
Age (year)			
<65	1	16	0.428
≥65	3	19	
Tumour size (cm)			
<2	3	20	0.491
≥2	1	15	
Tumour location			
Right colon	3	28	0.176
Left colon and rectum	2	6	
Tumour budding			
TB-negative (Bd0)	3	27	0.923
TB-positive (Bd1, Bd2)	1	8	

LV (lymphatic vessels), TB (Tumour Budding).

**Figure 2.** Tumour budding of an in situ colorectal carcinoma showing intermediate budding (Bd2) (CK CAM 5.2 ×200).

3.6. Patient's Follow-Up

Regarding clinical outcome, all patients were alive without disease, with a median follow-up of 49.62 months (range 13–86 months).

Table 3. Characteristics of pTis colorectal carcinomas according to OSNA results.

Category	OSNA + (Number)	OSNA – (Number)	<i>p</i>
Gender			
Male	7	16	0.711
Female	4	12	
Age (years)			
Mean	65.72	69.78	0.387
<65	6	11	
≥65	17	5	
Tumour size (cm)			
Mean	2.8	1.9	0.293
<2	5	18	
≥2	6	10	
Tumour location			
Right colon	9	26	0.307
Left colon and rectum	2	2	
Lymphatic vessels			
Mean	2.8	2.3	0.357
Low LV	9	25	
High LV	2	3	
Tumour budding			
TB-negative (Bd0)	7	23	0.217
TB-positive (Bd1, Bd2)	4	5	

OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification), LV (lymphatic vessels), TB (Tumour budding).

4. Discussion

This is a novel molecular study demonstrating the presence of tumour burden in regional LNs at very early stages of CRC. In all cases LNs were negative with H&E analysis (pN0), and the presence of low amounts of tumour burden within LNs was detected only by molecular methods. We also observed the presence of LVs in the lamina propria in all in situ CRC.

In situ CRC are non-invasive carcinomas, considered to have limited risk of LN metastasis [12]. Nevertheless, using LN molecular analysis, we have demonstrated the presence of small amounts of tumour load within the LNs of 28% pTis CRC. The presence of LVs in the colonic mucosa in inflammatory and neoplastic conditions has been previously demonstrated through a mechanism of lymphangiogenesis [5]. Accordingly, some studies unexpectedly identified metastatic spread in more than 1% of so-called “in situ” colorectal adenocarcinomas and have reported the capacity of pTis CRCs to metastasise to LNs. There are also single reports of lymphatic invasion in “intramucosal CRC”. In their opinion, it is biologically and clinically plausible that a small percentage of in situ CRC acquire the ability of LN dissemination without the necessity of submucosal invasion, since the lymphatic plexus is known to be present just above and within the muscularis mucosa. Thus, they claim that “intramucosal” CRCs with disruption or invasion through the muscularis mucosa can invade the LVs [21,22]. Lewin et al. reported 15 “intramucosal” poorly differentiated colorectal carcinomas originated in endoscopically resected adenomas, of which one case developed metastatic disease, and another was associated with Paget’s disease of the anal skin. The other 13 cases were alive without disease with a median follow-up of 13 months [23]. Shia et al. described two cases. One was an intramucosal poorly differentiated adenocarcinoma with 8 negative lymph nodes, which recurred 17 months after surgical resection, involving the omentum and the liver. The second case was an intramucosal adenocarcinoma originated on a tubulovillous adenoma, with the foci of lymphatic invasion at the base of the mucosa but not beyond the muscularis mucosae [24].

To our best knowledge, this is the first study including a series of surgical specimens of in situ CRCs in which LN assessment has been performed with both H&E and molecular methods. Further, LNs from normal colons and rectums are normally small-sized. Similarly, LN metastases from early CRC are usually small and located in LNs of ≤ 5 mm, which are difficult to identify. In this regard, Aldecoa et al. demonstrated that those LNs which are more prone to harbour tumour burden are those from the lymphatic basin which drain the tumour, usually located close to the tumour [25]. Another interesting finding of our work is that all in situ CRC had at least one LV in the lamina propria, demonstrated with D2-40 immunostaining. All our cases were confined to the mucosa, without invasion of the muscularis mucosae, did not have high-grade features, and were all pN0 by H&E. We found presence of tumour burden in the LNs of 11/39 cases (28%) by molecular analysis. This finding indicates that in situ CRCs are capable of invading intramucosal LVs more often than expected, being able to seed some tumour cells into regional LNs. Although we could not see any lymphovascular invasion in none of the tumours with CK immunostains, nine tumours had ITB, seven of them Bd1 and two Bd2, which we assume it is the way tumour cells reached the LVs. Additionally, most of our cases 76.9% (30/39) had Bd0, that is, complete absence of tumour budding. In this regard, Zlobec et al. showed that pT1 tumours with Bd0 are less aggressive than tumours with Bd1 [18]. In our cohort, the subgroup of in situ CRC with Bd0 had neither lesser number of LVs nor lower amounts of TTL in their LNs. As far as we know, there are no studies of pTis CRC and ITB. We neither found any significant correlation between the number of LVs present in the mucosa, presence of ITB, or any other clinicopathological factors, nor with OSNA positivity.

In our series, the presence of a low quantity of tumour load in regional LNs of in situ CRC had no clinical significance. In this regard, it is important to emphasize that it has been demonstrated that the TTL correlates with the pN, and that the amount of tumour burden in the LNs, or TTL, has prognostic value. Yamamoto demonstrated that the TTL increases with the pN stage of CRC, having 1550 copies/ μ L for pN0 cases, 24,050 copies/ μ L for pN1, and 90,600 copies/ μ L for pN2 cases [9]. In a recent study from our group, Archilla et al. validated these results, with similar values, finding 1775 copies/ μ L for pN0, 49,413 copies/ μ L for pN1 and 95,000 copies/ μ L for pN2 CRC. In fact, the TNM rules are based on the number of positive LNs, defined as tumour metastases ≥ 0.2 mm in size. Regarding the high sensitivity of molecular LN testing, the low TTL values probably correspond to ITCs rather than genuine metastases. These results are presumably reliable, and, if reported, would correspond to pN0 being the LN tumour burden detected only by molecular means. Our results confirm that even in pN0 CRC, a small amount of tumour burden is present within the LNs but most likely with no clinical consequences. A plausible explanation for the latter is that the mesocolic or mesorectal fat, which contains regional LNs, is removed with the surgical procedure. Thus, a regional lymphadenectomy is performed in curative-intended surgery, and with it, ITC and small groups of tumour cells not detected with H&E are removed, which may have no clinical consequences. Several studies have demonstrated a greater sensitivity in the identification of small amounts of tumour burden, i.e., isolated tumour cells or micrometastases with the use of the OSNA assay [9,20,26]. Molecular LN testing using quantitative methods is very useful since it gives the information of the amount of tumour burden within the LNs, which can guide the patient's clinical management. In addition, the TTL has been found to be a prognostic factor in CRC, with values of ≥ 6000 copies/ μ L associated with worse overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) [10,11]. Since none of our cases had neither LN metastases nor disease recurrence, our results could reinforce the current position that in situ carcinoma should be managed as for high grade dysplasia rather than invasive carcinoma. In addition, surgical removal of these lesions is associated with the morbidity and mortality of major surgery, which ranges from 3 to 20% [27]. In fact, colorectal cancer screening programmes have led to an increase in the detection of early CRC, including pTis, pT1 and pT2 stages. There are few studies regarding the recurrence rate of pTis, which are limited to rectal carcinomas, being 2.6% at five years and 6.7% at 10 years, and a cumulative incidence of

systemic recurrence of 0.8% at 5 years [28]. Even if the findings of our study may be of scientific relevance, they clearly demonstrate that tumour seeding into the LNs occurs at a very early stage of CRC development and should be taken into consideration.

One limitation of our study is that we have used half of the LN for the OSNA assay and the other half for H&E analysis, which may have induced a tumour allocation bias. Despite that, some tumour burden was identified in the part of the LN used for molecular analysis. Another limitation is that there was no statistical association between budding and vessel density/higher tumour burden by OSNA, or other clinicopathological features. Given the number of cases in our cohort, the analysis is probably underpowered.

5. Conclusions

In agreement with previous reports, we have also confirmed the presence of LVs in the lamina propria of pTis CRC. In addition, we have demonstrated that tumour cells from in situ CRC can seed the LNs, probably in the form of isolated tumour cells or small groups of cells, which confer no additional risk for these patients. The relevance of this study is that molecular assays enable to quantify the amount of tumour burden present in the LN compartment, which has been demonstrated to have prognostic value. In the setting of pTis CRC, the TTL can help patient's clinical management.

Author Contributions: Conceptualization, M.T.R.-C., A.D. and M.C.; Data curation, K.S.d.G., S.L.-P. and M.B.; Formal analysis, K.S.d.G., I.A., E.M. and M.C.; Funding acquisition, J.C. and M.C.; Investigation, M.T.R.-C. and M.C.; Methodology, M.T.R.-C., I.A., A.D., J.C. and M.C.; Project administration, M.T.R.-C., A.D. and M.C.; Resources, J.C. and M.C.; Supervision, M.T.R.-C., A.D., E.M. and M.C.; Validation, M.T.R.-C. and M.C.; Visualization, I.A.; Writing—original draft, M.T.R.-C., A.D., E.M. and M.C.; Writing—review & editing, M.T.R.-C., K.S.d.G., S.L.-P., I.A., A.D., M.B., E.M. and M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria Instituto de Salud Carlos iii, grant number PI20/00863 awarded to M.C. and J.C. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the ethics and scientific committee of our institution (Ref. HCB 2012/7324). All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We are indebted to the HCB-IDIBAPS Biobank, integrated in the Spanish National Biobanks Network, for the biological human samples and data procurement. We acknowledge the support of the Xarxa de Bancs de Tumours de Catalunya (XBTC), sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (PDO). We acknowledge the support of the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (Generalitat de Catalunya, SGR 01427). This research was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria PI20/00863 awarded to M.C. and J.C. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III. We thank Sysmex Spain S.L (Sant Just Desvern, Spain) for technical support. We also acknowledge the support of the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya.

Conflicts of Interest: The authors disclose that they have no significant financial interest or relationship with any commercial company related to this article.

References

1. Fogt, F.; Zimmerman, R.L.; Ross, H.M.; Daly, T.; Gausas, R.E. Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. *Oncol. Rep.* **2004**, *11*, 47–50. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Fenoglio, C.M.; Kaye, G.I.; Lane, N. Distribution of Human Colonic Lymphatics in Normal, Hyperplastic, and Adenomatous Tissue: Its relationship to metastasis from small carcinomas in pedunculated adenomas, with two case reports. *Gastroenterology* **1973**, *64*, 51–66. [\[CrossRef\]](#)
3. Rahbari, N.N.; Bork, U.; Motschall, E.; Thorlund, K.; Büchler, M.W.; Koch, M.; Weitz, J. Molecular detection of tumour cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 60–70. [\[CrossRef\]](#)
4. Sacchi, G.; Weber, E.; Aglianó, M.; Lorenzoni, P.; Rossi, A.; Caruso, A.M.; Vernillo, R.; Gerli, R.; Lorenzi, M. Lymphatic vessels in colorectal cancer and their relation with inflammatory infiltrate. *Dis. Colon Rectum* **2003**, *46*, 40–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Kenney, B.C.; Jain, D. Identification of Lymphatics within the Colonic Lamina Propria in Inflammation and Neoplasia Using the Monoclonal Antibody D2-40. *Yale J. Biol. Med.* **2008**, *81*, 103–113. [\[PubMed\]](#)
6. Tomita, T. Immunocytochemical localization of lymphatic and venous vessels in colonic polyps and adenomas. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53*, 1880–1885. [\[CrossRef\]](#)
7. Peg, V.; Espinosa-Bravo, M.; Vieites, B.; Vilardell, F.; Antúnez, J.R.; de Salas, M.S.; Delgado-Sánchez, J.J.; Pinto, W.; Gozalbo, F.; Petit, A.; et al. Intraoperative molecular analysis of total tumour load in sentinel lymph node: A new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *139*, 87–93. [\[CrossRef\]](#)
8. Yamamoto, N.; Daito, M.; Hiyama, K.; Ding, J.; Nakabayashi, K.; Otomo, Y.; Tsujimoto, M.; Matsuura, N.; Kato, Y. An optimal mRNA marker for OSNA (One-step nucleic acid amplification) based lymph node metastasis detection in colorectal cancer patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2013**, *43*, 264–270. [\[CrossRef\]](#)
9. Yamamoto, H.; Sekimoto, M.; Oya, M.; Yamamoto, N.; Konishi, F.; Sasaki, J.; Yamada, S.; Taniyama, K.; Tominaga, H.; Tsujimoto, M.; et al. OSNA-based novel molecular testing for lymph node metastases in colorectal cancer patients: Results from a multicenter clinical performance study in Japan. *Ann. Surg. Oncol.* **2011**, *18*, 1891–1898. [\[CrossRef\]](#)
10. Itabashi, M.; Yamamoto, H.; Tomita, N.; Inomata, M.; Murata, K.; Hayashi, S.; Miyake, Y.; Igarashi, S.; Kato, T.; Noura, S.; et al. Lymph Node Positivity in One-Step Nucleic Acid Amplification is a Prognostic Factor for Postoperative Cancer Recurrence in Patients with Stage II Colorectal Cancer: A Prospective, Multicenter Study. *Ann. Surg. Oncol.* **2020**, *27*, 1077–1083. [\[CrossRef\]](#)
11. Archilla, I.; Diaz-Mercedes, S.; Aguirre, J.J.; Tarragona, J.; Machado, I.; Rodrigo, M.T.; Lopez-Prades, S.; Gorostiaga, I.; Landolfi, S.; Alén, B.O.; et al. Lymph Node Tumour Burden Correlates With Tumour Budding and Poorly Differentiated Clusters: A New Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma? *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2021**, *12*, e00303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Hashimoto, H.; Horiuchi, H.; Kurata, A.; Kikuchi, H.; Okuyama, R.; Usui, G.; Masuda, Y.; Kuroda, M.; Inoue, S.; Furushima, K.; et al. Intramucosal colorectal carcinoma with lymphovascular invasion: Clinicopathological characteristics of nine cases. *Histopathology* **2019**, *74*, 1055–1066. [\[CrossRef\]](#)
13. Amin, M.B.; Edge, S.B.; Greene, F.L.; Byrd, D.R.; Brookland, R.K.; Washington, M.K.; Gershenwald, J.E.; Compton, C.C.; Hess, K.R.; Sullivan, D.C.; et al. *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed.; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2017.
14. Martin, J.C.; Boschetti, G.; Chang, C.; Ungaro, R.; Giri, M.; Chuang, L.S.; Nayar, S.; Greenstein, A.; Dubinsky, M.; Walker, L.; et al. Single-cell analysis of Crohn's disease lesions identifies a pathogenic cellular module associated with resistance to anti-TNF therapy. *bioRxiv* **2018**, *178*, 1493–1508. [\[CrossRef\]](#)
15. Duff, S.E.; Jeziorska, M.; Kumar, S.; Haboubi, N.; Sherlock, D.; O'dwyer, S.T.; Jayson, G.C. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Color. Dis.* **2007**, *9*, 793–800. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Lai, J.H.; Zhou, Y.J.; Bin, D.; Qiangchen; Wang, S.Y. Clinical significance of detecting lymphatic and blood vessel invasion in stage II colon cancer using markers D2-40 and CD34 in combination. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 1363–1367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Lugli, A.; Kirsch, R.; Ajioka, Y.; Bosman, F.; Cathomas, G.; Dawson, H.; El Zimaity, H.; Fléjou, J.-F.; Hansen, T.P.; Hartmann, A.; et al. Recommendations for reporting tumour budding in colorectal cancer based on the International Tumour Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod. Pathol.* **2017**, *30*, 1299–1311. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Zlobec, I.; Bächli, M.; Galuppini, F.; Berger, M.D.; Dawson, H.E.; Nagtegaal, I.D.; Lugli, A. Refining the ITBCC tumour budding scoring system with a “zero-budding” category in colorectal cancer. *Virchows Arch.* **2021**, *479*, 1085–1090. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Rakislova, N.; Montironi, C.; Aldecoa, I.; Fernandez, E.; Bombi, J.A.; Jimeno, M.; Balaguer, F.; Pellise, M.; Castells, A.; Cuatrecasas, M. Lymph node pooling: A feasible and efficient method of lymph node molecular staging in colorectal carcinoma. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 14. [\[CrossRef\]](#)
20. Tsujimoto, M.; Nakabayashi, K.; Yoshidome, K.; Kaneko, T.; Iwase, T.; Akiyama, F.; Kato, Y.; Tsuda, H.; Ueda, S.; Sato, K.; et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4807–4816. [\[CrossRef\]](#)
21. Bracey, T.; Mathew, J. Metastatic intramucosal colorectal adenocarcinoma: A case to support review of current concepts (and staging) of early colorectal cancer. *Histopathology* **2015**, *66*, 906–907. [\[CrossRef\]](#)
22. Lan, Y.T.; Yang, S.H.; Li, A.F.Y.; Lin, J.K. Conflicting finding on intramucosal colon cancers based on national survival outcomes data. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2433. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

23. Lewin, M.R.; Fenton, H.; Burkart, A.L.; Sheridan, T.; Abu-Alfa, A.K.; Montgomery, E.A. Poorly differentiated colorectal carcinoma with invasion restricted to lamina propria (intramucosal carcinoma): A follow-up study of 15 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **2007**, *31*, 1882–1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shia, J.; Klimstra, D.S. Intramucosal poorly differentiated colorectal carcinoma: Can it be managed conservatively? *Am. J. Surg. Pathol.* **2008**, *32*, 1588–1589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Aldecoa, I.; Montironi, C.; Planell, N.; Pellise, M.; Fernandez-Esparrach, G.; Gines, A.; Delgado, S.; Momblan, D.; Moreira, L.; Lopez-Ceron, M.; et al. Endoscopic tattooing of early colon carcinoma enhances detection of lymph nodes most prone to harbor tumour burden. *Surg. Endosc. Other Interv. Tech.* **2016**, *31*, 723–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hiyoshi, Y.; Akiyoshi, T.; Fukunaga, Y. The advantage of one-step nucleic acid amplification for the diagnosis of lymph node metastasis in colorectal cancer patients. *Ann. Gastroenterol. Surg.* **2020**, *5*, 60–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Vermeer, N.C.A.; Backes, Y.; Snijders, H.S.; Bastiaannet, E.; Liefers, G.J.; Moons, L.M.G.; Van De Velde, C.J.H.; Peeters, K.C.M.J. National cohort study on postoperative risks after surgery for submucosal invasive colorectal cancer. *BJS Open* **2018**, *3*, 210–217. [[CrossRef](#)]
28. Oh, B.Y.; Yun, H.R.; Kim, S.H.; Yun, S.H.; Kim, H.C.; Lee, W.Y.; Chun, H.K.; Cho, Y.B. Features of late recurrence following transanal local excision for early rectal cancer. *Dis. Colon Rectum* **2015**, *58*, 1041–1047. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Segundo estudio

Lymph node molecular analysis with OSNA enables to identify pT1 CRC patients at risk of recurrence. A multicentre study

Karmele Saez de Gordo, **Maria Teresa Rodrigo-Calvo**, Ivan Archilla, Sandra Lopez-Prades, Alba Diaz, Jordi Tarragona, Isidro Machado, Juan Ruiz Martín, Diana Zaffalon, María Daca-Alvarez, Maria Pellisé, Miriam Cuatrecasas
Cancers (Basel). 2023 Nov 20;15(22):5481

Resumen:

Este estudio se enfoca en el CCR pT1, que a menudo se diagnostica a través de programas de detección precoz. Existe un debate significativo sobre la mejor forma de abordar el tratamiento de estos pacientes, con el objetivo de evitar tanto el tratamiento excesivo como el insuficiente. En este estudio, se utiliza la técnica OSNA, un ensayo molecular cuantitativo, para detectar la presencia y la cantidad de células tumorales metastásicas en los ganglios linfáticos. La positividad de OSNA con CTT > 6.000 copias mRNA CK19/μL se asocia a peor pronóstico en CCR. Esto significa que cuando el OSNA detecta células tumorales metastásicas en los ganglios linfáticos, podría indicar un mayor riesgo de progresión del cáncer y, por lo tanto, influir en las decisiones de tratamiento. Se detectó positividad con OSNA en 24,7% CCR pT1, de los cuales 3 tuvieron CTT >6.000 copias mRNA CK19/μL. No obstante, los pacientes no recidivaron ni se asoció a peor pronóstico. Esta información podría ser valiosa para los clínicos en la toma de decisiones terapéuticas, ya que les proporciona información sobre el riesgo de progresión del cáncer y ayuda a evitar tratamientos excesivos o insuficientes en estos pacientes.

Article

Lymph Node Molecular Analysis with OSNA Enables the Identification of pT1 CRC Patients at Risk of Recurrence: A Multicentre Study

Karmele Saez de Gordo^{1,2,†}, Maria Teresa Rodrigo-Calvo^{1,2,†}, Ivan Archilla^{1,2}, Sandra Lopez-Prades^{1,2}, Alba Diaz^{1,2,3,4}, Jordi Tarragona⁵, Isidro Machado^{6,7}, Juan Ruiz Martin⁸, Diana Zaffalon⁹, Maria Daga-Alvarez¹⁰, Maria Pellisé^{2,3,10}, Jordi Camps^{2,3,11} and Miriam Cuatrecasas^{1,2,3,4,*}

¹ Pathology Department, Centre of Biomedical Diagnosis (CDB), Hospital Clinic, 08036 Barcelona, Spain; saezdegord@clinic.cat (K.S.d.G.); mtrodrigo@clinic.cat (M.T.R.-C.); archilla@clinic.cat (I.A.); slopezp@recerca.clinic.cat (S.L.-P.); madiatz@clinic.cat (A.D.)

² August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; mpellise@clinic.cat (M.P.); jordi.camps@uab.cat (J.C.)

³ Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 28029 Madrid, Spain

⁴ Department of Clinical Foundations, University of Barcelona (UB), 08036 Barcelona, Spain

⁵ Pathology Department, Hospital Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain; jtarragona@gss.cat

⁶ Pathology Department, Instituto Valenciano de Oncología, Hospital Quirón-Salud Valencia, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; isidro.machado@uv.es

⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red en Cáncer (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain

⁸ Pathology Department, Virgen de la Salud Hospital, 45071 Toledo, Spain; jmartin@sescam.jccm.es

⁹ Gastroenterology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, 08227 Terrassa, Spain; dzaffalon@cst.cat

¹⁰ Gastroenterology Department, Hospital Clinic, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; daga@clinic.cat

¹¹ Cell Biology and Medical Genetics Unit, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Spain

* Correspondence: mkuatrec@clinic.cat; Tel.: +34-932275536

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Saez de Gordo, K.; Rodrigo-Calvo, M.T.; Archilla, I.; Lopez-Prades, S.; Diaz, A.; Tarragona, J.; Machado, I.; Ruiz Martin, J.; Zaffalon, D.; Daga-Alvarez, M.; et al. Lymph Node Molecular Analysis with OSNA Enables the Identification of pT1 CRC Patients at Risk of Recurrence: A Multicentre Study. *Cancers* **2023**, *15*, 5481. <https://doi.org/10.3390/cancers15225481>

Academic Editor: Alain P. Gobert

Received: 13 October 2023

Revised: 11 November 2023

Accepted: 14 November 2023

Published: 20 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: This study focuses on very-early-stage colorectal cancer (CRC), pT1, frequently diagnosed under the umbrella of CRC screening programs. There is a great deal of debate about how best to treat pT1 CRC to avoid the overtreatment or undertreatment of patients. The authors use the RT-PCR-based quantitative molecular assay OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification), which detects the presence and amount of metastatic tumour cells in the lymph nodes of pT1 CRC surgical specimens. Its positivity is related to high-risk clinicopathological features. This study gives insights into the application of OSNA in early-stage CRC and its usefulness in improving management decisions.

Abstract: Early-stage colorectal carcinoma (CRC)—pT1—is a therapeutic challenge and presents some histological features related to lymph node metastasis (LNM). A significant proportion of pT1 CRCs are treated surgically, resulting in a non-negligible surgical-associated mortality rate of 1.5–2%. Among these cases, approximately 6–16% exhibit LNM, but the impact on survival is unclear. Therefore, there is an unmet need to establish an objective and reliable lymph node (LN) staging method to optimise the therapeutic management of pT1 CRC patients and to avoid overtreatment or undertreating them. In this multicentre study, 89 patients with pT1 CRC were included. All histological features associated with LNM were evaluated. LNs were assessed using two methods, One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) and the conventional FFPE plus haematoxylin and eosin (H&E) staining. OSNA is an RT-PCR-based method for amplifying CK19 mRNA. Our aim was to assess the performance of OSNA and H&E in evaluating LNs to identify patients at risk of recurrence and to optimise their clinical management. We observed an 80.9% concordance in LN assessment using the two methods. In 9% of cases, LNs were found to be positive using H&E, and in 24.7% of cases, LNs were found to be positive using OSNA. The OSNA results are provided as the total

tumour load (TTL), defined as the total tumour burden present in all the LNs of a surgical specimen. In CRC, a TTL ≥ 6000 CK19 m-RNA copies/ μ L is associated with poor prognosis. Three patients had TTL > 6000 copies/ μ L, which was associated with higher tumour budding. The discrepancies observed between the OSNA and H&E results were mostly attributed to tumour allocation bias. We concluded that LN assessment with OSNA enables the identification of pT1 CRC patients at some risk of recurrence and helps to optimise their clinical management.

Keywords: pT1 colorectal cancer; lymph node; staging; diagnosis; OSNA

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide, with 1,931,590 new diagnoses each year, and it is the second leading cause of cancer-related death in both men and women [1]. CRC carcinogenesis is related to genetic and environmental factors, with the latter comprising obesity, physical inactivity, a high red meat intake, alcohol consumption, and cigarette smoking, together with an imbalance of gut microbiota [2–4]. In fact, the adoption of “Western” lifestyles in some countries has led to an increase in the incidence of CRC. Thus, several countries have implemented CRC screening programmes in the average-risk population as a secondary prevention measure. CRC screening is a feasible and cost-effective intervention, since it meets all criteria for screening: (a) it has a high incidence; (b) it is perceived by the population as a health problem; (c) it has a stepwise process of development over a period of time; (d) the premalignant lesion is well known; (e) the different intermediate stages of premalignant and invasive malignant lesions are most ideal for cancer prevention and early diagnosis in the early stages when it is still curable; and (f) the screening test is inexpensive and accepted by the population. In addition, the most relevant accomplishments of CRC screening are the reduction in CRC-related deaths and the increase in early cancer detection, since about 70% of all CRCs diagnosed are at stages I–II (pT1–4 pN0), and up to 38% are pT1 CRC cases [5].

According to the published guidelines for localised CRC published by the European Society of Medical Oncology (ESMO), pT1 CRC should be treated with a complete en bloc endoscopic resection whenever possible, and patients with tumours that harbour histological high-risk factors should undergo oncologic surgery with lymph node dissection [6]. The pathological risk factors associated with lymph node metastasis (LNM) in pT1 CRC include lymphovascular invasion (LVI), perineural invasion (PNI), a high histological grade, high tumour budding (TB) and poorly differentiated clusters (PDCs), deep submucosal infiltration, and complete disruption of the muscularis mucosae [6–9]. Although a high percentage of these pT1 carcinomas are surgically treated, only 6–16% of patients have LNM, with no clear impact on survival. In addition, there is a non-negligible surgical-associated mortality of 1.5–2% [10].

Another important issue for these patients is that the detection of micrometastases in lymph nodes (LNs) may be difficult to achieve at such an early stage of the disease, since haematoxylin and eosin (H&E) sensitivity is low for the detection of small metastatic tumour nests. Therefore, despite surgical resection being performed, pN staging with H&E may not be accurate enough. For all the above, more precise methods are needed to determine whether surgically treated pT1 patients are at risk of recurrence.

The OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) assay is a RT-PCR-based technique for detecting CK19 mRNA. It is a quantitative, fast, and standardised assay, and it has been validated for lymph node molecular analysis in breast and CRC [11–13]. OSNA has proven to be more sensitive than H&E for the detection of LN micrometastases in CRC [11]. The OSNA results are given as the total tumour load (TTL), defined as the sum of all copies of CK19 mRNA present in all the lymph nodes of a surgical resection specimen. Previous studies have shown that a TTL ≥ 6000 copies/ μ L is associated with a poorer overall and

disease-free survival. Thus, TTL has been proposed as a prognostic factor in early-stage CRC [14].

The aim of this study was to analyse the LNs of surgical resections from pT1 CRCs with the OSNA assay to enable the identification of patients at risk of recurrence and the optimisation of their therapeutic management.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Samples

This is an observational multicentre prospective–retrospective study conducted between 2012 and 2020, including patients with a pT1 CRC who underwent surgical resection and an analysis of LNs with OSNA. Eighty-nine pT1 CRC patients were included from 4 participating centres. All patients were treated with oncologic surgical resection. Most of the recruited patients were diagnosed under the umbrella of the CRC screening programme after a positive faecal immunochemical occult blood test (FIT) (OC-Sensor®, Eiken, Tokyo, Japan).

A total of 40 (44.9%) patients were primarily treated with surgical resection, and 49 (55.1%) were initially treated with endoscopic resection followed by surgery, as they presented histological risk factors for LNM. Lymph nodes were assessed using two methods, H&E and the OSNA assay. The mean age was 62.6 years old (range 31–88), and 49 (55.1%) were male. Most tumours were on the left colon (44; 49.4%) and originated on non-pedunculated polyps (71; 79.8%). Relevant clinicopathological data are presented in Table 1.

Table 1. Clinical and pathological features of pT1 colorectal carcinomas.

Category	N (Total)	N (%)
Gender		
Male	49	55.06
Female	40	44.94
Location		
Right colon	33	37.08
Left colon	44	49.44
Rectum	12	13.48
Polyp type		
Pedunculated	18	20.22
Non-pedunculated	71	79.78
Follow-up		
Alive without disease	82	92.13
Dead from other causes	3	3.37
Lost to follow-up	4	4.49

2.2. Ethical Considerations

This study was approved by the Ethics and Scientific Committee of our institution (HCB 2012/7324). All patients signed and kept a copy of the informed consent document for participation in the study after the nature of the research was fully explained. Another copy was kept with each patient's clinical files, and a third copy was kept in the Biobank files of our institution.

2.3. Lymph Node Dissection and One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA)

Lymph nodes from surgical specimens were freshly dissected within 45 min after surgery, using the pooling method as previously described by Rakislova et al. [15], which analyses multiple lymph nodes in the same PCR tube, up to a 600 mg weight limit of the OSNA assay. Briefly, we used one-half of the LN for conventional processing, with formalin fixation and paraffin embedding (FFPE). Then, 3 µm thick cuts of paraffin blocks containing the LNs were stained with H&E. The other half of the LN was used for an OSNA analysis.

The OSNA molecular technique (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) is a quantitative assay, which amplifies cytokeratin 19 (CK19) mRNA from lymph node lysates in three steps, the homogenisation, centrifugation, and amplification of CK19 mRNA using RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification). Firstly, the LN tissue is homogenised with 4 mL of Lynorhag lysate buffer for 60 s using RP-10 equipment (Sysmex, Kobe, Japan), which stabilises the mRNA molecules and protects them against ribonuclease activity, minimising the effect of inhibitory substances and precipitating the genomic DNA. Subsequently, 1 mL of the resulting product is centrifugated at $12,000 \times g$ for 1 min at room temperature to remove cell debris. Then, amounts of 500 + 500 μ L are taken from the intermediate phase and put into two PCR tubes, corresponding to the backup sample and the main sample. Then, 20 μ L from the main sample is diluted in 180 mL of Lynorhag buffer to a 1:10 concentration (analysis sample), which is put into an RD-210 amplifier (Sysmex Europe GmbH), and the isothermal amplification of CK19 mRNA is performed at 65 °C using the Lymoamp reagent. RD-210 can analyse 14 samples simultaneously. The backup sample is frozen at −80 °C for reanalysis if needed. During the amplification reaction, pyrophosphate is produced, which binds to a magnesium ion, turning into magnesium pyrophosphate, which has a low solubility in aqueous solutions and precipitates when its concentration reaches saturation, producing turbidity in the medium, which is detected using the RD-210 platform. Once the turbidity reaches an optical density value of 0.1 at 465 nm, a time threshold is established, from which the CK19 mRNA copy number is determined. The turbidity measurement is performed in real time at 6 s intervals.

2.4. Lymph Node pN Staging and OSNA Results

For all cases, pN staging was reported using conventional H&E staining of part of the LN used for FFPE.

The OSNA results were blind to both the pathologists and the clinicians, and they were obtained from the analysis of the other part of the LN. The OSNA results are expressed as the TTL, defined earlier. A TTL of ≥ 250 copies of CK19 m-RNA/ μ L was defined as the positive threshold of the technique. The cut-off value that we considered as clinically significant was ≥ 6000 copies/ μ L, as this has been reported to have prognostic value [14].

2.5. Histological Evaluation of pT1 CRC

The H&E-stained slides of all pT1 CRCs were re-evaluated by a gastrointestinal pathologist (MR) and a fellow resident (KS), following the published guidelines for pT1 pathological diagnosis, without any information about the patient's follow-up or lymph node status [8,16–22]. The only clinical information available at the time of the histological evaluation was the endoscopy report assessing the location and type of polyp (pedunculated or non-pedunculated). A double-head Olympus BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) was used for the evaluation of all histological factors, i.e., polyp size, tumour size, histological grade, TB, PDC, LVI, PNI, the disruption of the muscularis mucosae, the depth of submucosal infiltration, and resection margin status.

2.6. Statistical Analysis

Fisher's exact test was used to measure the association between lymph node status and the frequencies of categorical variables, whereas the Kruskal–Wallis test was used to compare the means and medians of quantitative variables and LN status. $p < 0.05$ was considered statistically significant. The concordance of H&E and OSNA was evaluated with the percentage of agreement. For this analysis, we used the R program (4.0.3 version; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3. Results

3.1. Comparison of Lymph Node Status Assessed with H&E and OSNA

All lymph nodes were assessed with both H&E and OSNA, using half of the LNs for each method. In eight cases (9.0%), the lymph nodes were determined to be positive with

H&E, and 22 cases (24.7%) were determined to be positive with OSNA. In three cases, the TTL was >6000 copies/ μ L.

In 72 cases (80.9%), there was agreement in the results of the two methods, with 6 cases being concordantly positive and 66 cases being concordantly negative. One of the latter cases had 10 freshly dissected LNs determined to be concordantly negative with both H&E and OSNA. In addition, 13 extra LNs were dissected after formalin fixation, and they were only analysed with H&E; 1/13 positive LNs resulted in pN1a staging. The H&E-positive cases (pN1) had a mean TTL of 9241 copies/ μ L (median 5000 copies/ μ L; range 220–40,740 copies/ μ L).

Among the 17 discordant cases, 16 were found to be positive with OSNA and negative with H&E, with all of them harbouring TTL < 6000 copies/ μ L (mean 1540.6 copies/ μ L; median 990 copies/ μ L; range 260–5220 copies/ μ L). One case was found to be positive with H&E and negative with OSNA, and it had a TTL of 220 copies/ μ L (below the 250 copies/ μ L threshold of the method for positivity). This case can be considered a false negative of the OSNA technique, probably due to tumour allocation bias (Figure 1).

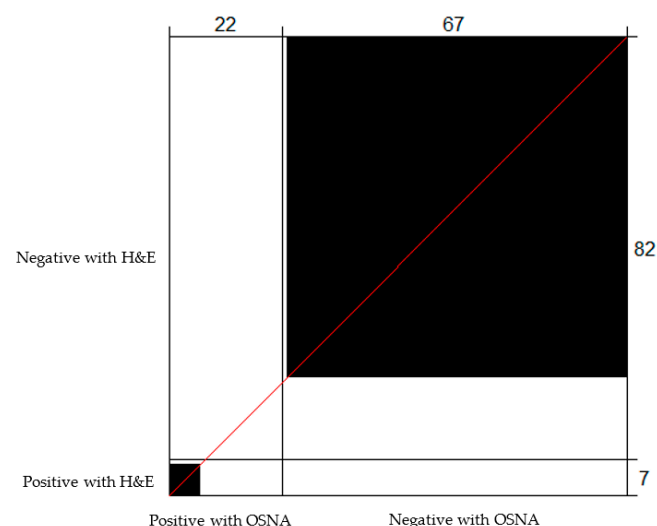


Figure 1. Bangdiwala's Observer Agreement Chart comparing the lymph node status determined using OSNA and H&E. The black boxes correspond to concordant cases. Of the 22 cases determined to be positive with OSNA, H&E was positive for 6, and 66 out of 82 cases determined to be negative with H&E were also determined to be negative with OSNA.

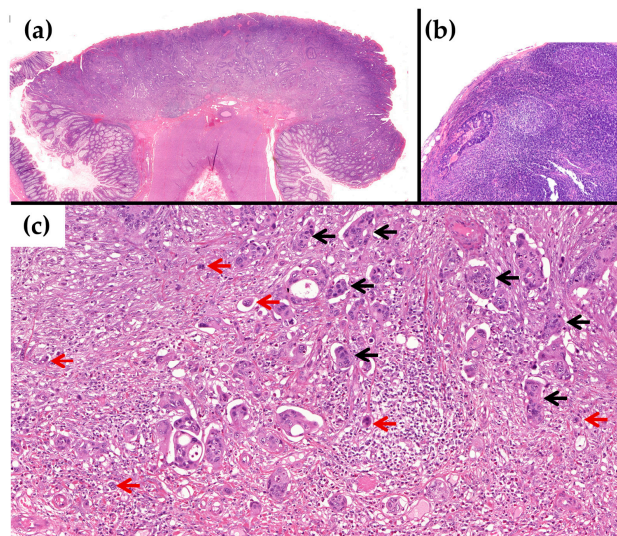
3.2. Pathological Characteristics Related to Lymph Node Metastases

The histological features associated with LNM when assessed with H&E were TB ($p = 0.015$), PDC ($p = 0.028$), and the presence of LVI ($p = 0.03$). On the contrary, no association was found with PNI, histological grade, the disruption of the muscularis mucosae, the status of the resection margins, tumour size, or the depth of submucosal infiltration.

We then assessed the association of some histological features with the OSNA results, comparing the cases below and above TTL 6000 copies/ μ L, since this value is related to prognosis. Although there were only three cases with a TTL > 6000 copies/ μ L, a statistically significant association was observed with TB ($p = 0.038$). A non-significant trend was observed with PDC and LVI ($p = 0.073$ each). All other histological factors showed no association (Table 2 and Figure 2).

Table 2. Pathological risk factors associated with LN status assessed with H&E and OSNA.

	Total (%)	H&E Negative (%)	H&E Positive (%)	<i>p</i> -Value	OSNA 250-5999 Copies/ μ L (%)	OSNA $\geq$ 6000 Copies/ μ L (%)	<i>p</i> -Value
Histological grade							
Low grade	72 (80.9)	66 (91.7)	6 (8.3)	0.093	16 (88.9)	2 (11.1)	0.470
High grade	17 (19.1)	13 (76.5)	4 (23.5)		3 (75.0)	1 (25.0)	
Tumour budding							
Bd1	73 (82.0)	68 (93.2)	5 (6.8)	0.015	18 (94.7)	1 (5.3)	0.038
Bd2	10 (11.2)	7 (70)	3 (30)		1 (33.3)	2 (66.7)	
Bd3	6 (6.7)	4 (66.7)	2 (33.3)		0 (0)	0 (0)	
Poorly differentiated clusters							
G1	77 (86.5)	71 (92.2)	6 (7.8)	0.028	17 (94.4)	1 (5.6)	0.073
G2	8 (9.0)	5 (62.5)	3 (37.5)		2 (50.0)	2 (50.0)	
G3	4 (4.5)	3 (75)	1 (25)		0 (0)	0 (0)	
Disruption of muscularis mucosa				1			
Partial	30 (33.7)	27 (90.0)	3 (30.0)		3 (75.0)	1 (25.0)	0.470
Complete	59 (66.3)	52 (88.1)	7 (11.9)		16 (88.9)	2 (11.1)	
Lymphovascular invasion				0.003			0.073
Absent	77 (86.5)	72 (93.5)	5 (6.5)		17 (94.4)	1 (1.3)	
Present	12 (13.5)	7 (58.3)	5 (41.7)		2 (16.7)	2 (16.7)	
Perineural invasion				0.112			0.1364
Absent	88 (98.9)	79 (89.8)	9 (10.2)		19 (21.6)	2 (2.3)	
Present	1 (1.1)	0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)	
Resection margin status				0.804			1
Free	74 (83.1)	66 (89.2)	8 (10.8)		17 (23.0)	3 (4.1)	
Affected	9 (10.1)	8 (88.9)	1 (11.1)		1 (11.1)	0 (0)	
Non assessable	6 (6.7)	5 (83.3)	1 (16.7)		1 (16.7)	0 (0)	
Tumour size (mm)	Median	10	12.5	0.412	12	10	0.502
Depth of submucosal infiltration (mm)	Median	2.5	3	0.521	2.5	3	0.438

**Figure 2.** Example of a case with TTL > 6000 copies/ μ L with OSNA and a positive LN status with H&E. (a) Low power of the pT1 CRC with submucosal infiltration, which was resected primarily on surgery (H&E $\times$ 20). (b) Lymph node with metastasis of the adenocarcinoma (H&E $\times$ 100). (c) At higher power, the tumour shows high TB, Bd3 (red arrows), and G3 PDC (black arrows) on the infiltrating margin (H&E $\times$ 200).

3.3. Patient Follow-Up

Six patients determined to have positive lymph nodes with H&E received adjuvant chemotherapy. The follow-up period was between five months and eight years, and most patients were alive without disease (82 patients; 92.1%). Three patients died from other causes, and four were lost to follow-up. None of the patients had distant metastases or recurrence of the disease, and no differences regarding the prognosis of the patients were found when the LN status was assessed with either H&E or OSNA ($p = 0.62$ and $p = 0.58$, respectively).

4. Discussion

This study demonstrates that an analysis of the LNs from pT1 CRCs with the OSNA quantitative molecular assay, which detects the amount of tumour burden in the LNs, can identify patients at some risk of progression. This highly sensitive molecular method of LN analysis enables the detection of pT1 CRCs capable of LN tumour cell seeding, and it separates them from those with completely negative LNs; therefore, it enables the optimisation of pT1 CRC patients' therapeutic management. Moreover, the quantitative TTL results are associated with the clinicopathological features related to LNM, and the assessment of the amount of tumour cells within the LNs gives additional prognostic information on early-stage CRC, considering that a TTL of ≥ 6000 copies/ μL has been associated with a poorer overall- and disease-free survival [14]. Therefore, in this study, we only considered a TTL of ≥ 6000 copies/ μL with potential clinical relevance. Initially, LN lymph node micrometastases in CRC were thought to have no clinical significance [23], but a meta-analysis by Rahbari et al. revealed that molecular tumour cell detection in regional LNs, otherwise found to be negative with H&E (pN0), was associated with poor overall survival, disease-free survival, and disease-specific survival [24,25]. Interestingly, another meta-analysis by Sloothaak et al., which included studies that had used immunohistochemistry to assess LNM, reported that patients with micrometastases were at higher risk of tumour recurrence. However, the finding of isolated tumour cells (ITCs) had no impact on disease-free survival [26].

A relevant finding of our study was the higher LN positivity found when using OSNA (22 cases; 24.7%), compared to the positivity found when using H&E (7 cases; 7.9%). The three cases with TTL > 6000 copies/ μL were also positive with H&E, which reflects the importance and reliability of TTL values. There were sixteen cases with negative LNs with H&E but positive with OSNA, with TTL < 6000 copies/ μL , which may represent either micrometastases or ITC. The discordances are most likely explained by tumour allocation bias, as part of the LN was used for OSNA and part was used for conventional staging with H&E, which analyses only one 3 μm central section of the LN [27,28].

We analysed the histological features associated with LNM with LN positivity using both H&E and OSNA. In line with the results reported by Archilla et al. [14], we also observed that TB was associated with OSNA TTL ≥ 6000 copies/ μL and H&E positivity. Tumour budding is a proven risk factor for LNM in pT1 CRC [7,16,18,29–40], and the current guidelines recommend undergoing surgery in cases with high TB (Bd3) [6]. PDCs have been described more recently, and they are defined as cancer nests composed of ≥ 5 cancer cells showing no gland-like structure [16–19]. PDCs are considered an histological risk factor for LNM in pT1 CRC [9,41]. We found that PDCs were associated with LNM assessed with H&E, with a non-significant trend with OSNA, probably due to the small number of cases with a TTL > 6000 copies/ μL . Both TB and PDC have been proposed to be evaluated together in a “Combined Score”, as they both may refer to the same biological phenomenon of epithelial-to-mesenchymal transition, but there is still some controversy among experts [42–45]. In addition, we also observed that the presence of LVI was associated with LNM when assessed with H&E. As is well known, the presence of LVI is a significant risk factor for LNM in pT1 CRC [5,7,16–18,29,30,35–41,46–48].

We did not find an association between PNI and LNM with either method of LN analysis. However, we must consider that PNI is a feature seldom found in pT1 CRC. Neverthe-

less, an association between LNM and PNI has been widely demonstrated in more advanced stages of CRC, which is also related to disease-free and overall survival [7,10,16,24,26,29,31,37,38,45,47,49]. Further, we found no relation between LNM and the depth of submucosal infiltration when analysed with either method. This feature has been associated with LNM in several studies, but different cut-off points have been considered for risk stratification [7,8,17,18,29–32,34–38,40,47,50]. In a recent meta-analysis, Zwager et al. showed no significant association between LNM and the depth of submucosal infiltration [32]. A high histological grade is also considered to confer a higher risk for the presence of LNM, being consistently reported in the literature [5,7,8,16,29,30,32,34–38,40,45–47,51,52], while other studies have not found such a relationship [9,17,39,41,48]. In our study, we did not observe any association between a high histological grade and LNM. Finally, another histological feature that we found not to be related to LNM was the disruption of the muscularis mucosae. There has been some debate about the importance of the complete disruption of the muscularis mucosae. While some authors have demonstrated its association with LNM, not only in pedunculated polyps but in all types of polyps, other authors have not observed such a link [9,30,31,36].

Although a histopathologic analysis remains the gold standard in the diagnosis and risk classification of CRC, it has many limitations. In recent years, the introduction of artificial intelligence (AI) has influenced different fields of medicine, including CRC diagnosis [53]. AI may be used as a diagnostic tool for tissue classification and the prediction of outcomes [54,55]. In pT1 CRC, AI models identify patients at risk of LNM more accurately than histopathologic diagnosis following the current guidelines [56].

The meaning of the amount of TTL is of outmost importance, and, therefore, it is in accordance with its clinical significance. In fact, the TTL of sentinel lymph nodes (SLNs) in breast carcinoma is associated with disease-free survival and overall survival, and, in the intraoperative setting, the TTL of SLNs is a surrogate indicator of the status of non-SLNs; thus, its value is critical for deciding the need to perform lymphadenectomy [57,58]. In this same context, the role of the molecular detection of LN metastasis using OSNA in patients with breast cancer who have received systemic neoadjuvant therapy has recently been explored. Thus, a TTL $\geq 15,000$ copies/ μL in SLNs has been shown to be a predictive factor for metastasis in non-sentinel lymph nodes, with a negative predictive value (NPV) of 90.5%, while a TTL $\geq 25,000$ copies/ μL is related to worse disease-free survival [59].

Before the demonstration of the prognostic value of the TTL in CRC, there was some evidence indicating that low TTL values of ≥ 250 copies/ μL , although considered “positive”, did not correspond to patient upstaging, and were not associated with prognosis [60]. The reported rates of positivity and of nodal upstaging using OSNA in CRC are variable among different studies; i.e., Aldecoa et al. reported that up to 51% of pN0 patients with H&E had OSNA-positive LNs, while Croner et al. found it to be 25.2%, Yamamoto et al. found it to be 17.6%, and Tani et al. found it to be 9.1% [61,62]. Some authors initially observed an association between the TTL with high-risk clinicopathological features and observed that pT1 CRC had lower TTL values than tumours with deeper infiltration, finding a correlation between the TTL and pT stage [61,62]. In line with this, Yamamoto et al. showed that the TTL was related to pN stage with H&E, as pN0 cases had a median of 1500 copies/ μL , while those with pN1 had 24,050 copies/ μL , and pN2 cases had 90,600 copies/ μL [27]. Archilla et al. found similar results, with a mean TTL in pN0 of 1775 copies/ μL , pN1 of 49,413 copies/ μL , and pN2 of 95,000 copies/ μL [14]. Their results were validated by Diaz-Mercedes et al., observing a mean TTL in pN0 of 433.6 copies/ μL , pN1 of 35,782.6 copies/ μL , and pN2 of 144,651.8 copies/ μL [14,27,63]. In our study, the tumour burden in the LNs of pT1 CRC with pN0 determined with H&E was lower, with a median of 990 copies/ μL (mean 1540.6 copies/ μL), while pN1 cases had a median of 5000 copies/ μL (mean 9241 copies/ μL).

Therefore, an important message about LN status when detected with highly sensitive molecular methods is that any OSNA positivity is not equivalent to patient upstaging and that low TTL values may not have clinical consequences. In fact, the high sensitivity

of OSNA can detect tumour cell seeding to LNs, even in pTis CRC, as demonstrated by Rodrigo-Calvo et al., who found that TTL values below 6000 copies/ μ L (range 400 to 4270 copies/ μ L) had no clinical significance. They suggested that these TTL values might represent the presence of ITCs in the LNs of pTis CRC [64]. Yet, the meaning of the presence of ITC in CRC is still controversial. In view of their results, it would be of interest to reliably distinguish the significance of ITC from micrometastases assessed with OSNA.

Our study has some limitations. The most determinant one is that part of the LNs was assessed with H&E and part was assessed with OSNA, which causes an intrinsic tumour allocation bias whenever the tumour metastasis is little enough to be contained only in one part of the LN. In fact, this is the most plausible explanation for our discordant cases. This could be solved by submitting the whole LN for molecular analysis, as carried out in LNs from breast carcinoma [13,28]. In fact, all the OSNA studies on CRC to date have used similar methodologies, with part of the LN used for H&E and part used for OSNA, which may be the reason for the false negativities and the limiting of its applicability in general practice [65]. We had 1.1% false negatives, but this rate has been reported up to 15.4% in other series [61]. Despite this limitation, almost all published studies have shown good performance of this technique, showing a high sensitivity (90.4%), specificity (96.8%), concordance (96.0%), positive predictive value (79.8%), and negative predictive value (98.6%) [28,65]. In this regard, OSNA LN staging can be improved and achieve its full clinical significance and impact in early-stage CRC only through a complete analysis of the LN tissue. Only then will the TTL values be able to be validated for CRC LN assessment. In this regard, Diaz-Mercedes et al. performed an intermediate step by demonstrating that LN cytological smears could be used to determine the pN stage, enabling the use of the whole LN tissue for OSNA. In fact, they found that cytological LN smears immunostained with CK19 had a similar performance to the OSNA assay in the determination of LN positivity, and they were more sensitive than H&E ($p < 0.0001$) [63]. Another limitation of our study is the small number of cases, since the recurrence of disease in pT1 CRC is only 3.3%, and the proportions of cases with metastases and death from the disease are even lower, being 1.6% and 1.7%, respectively [42]. Therefore, we are unable to make any statement about the prognostic implications of the LN status assessed using either OSNA or H&E. Another minor issue is the finding of LNs located in the fat very close to the colorectal wall, which may not be freshly dissected, and they were therefore assessed only using H&E. Indeed, one of our cases had LNM in an additional LN dissected after formalin fixation. Missing lymph nodes in fresh dissection can occur, but all LNs dissected after FFPE must be assessed only using conventional H&E, and they still contribute to the pN stage [62,64].

To the best of our best knowledge, this is the first OSNA study focusing on pT1 CRC. We have demonstrated that it enables the identification of patients at risk of recurrence, which helps the optimisation of their clinical management.

5. Conclusions

A molecular analysis of LNs from pT1 CRCs provides more information on the real nodal status than H&E. Patients with TTL ≥ 6000 copies/ μ L may be candidates for a closer follow-up and could be considered for adjuvant therapy; therefore, an OSNA LN analysis can contribute to improve the management of patients with early-stage CRC.

Author Contributions: Conceptualisation, K.S.d.G., M.T.R.-C., I.A. and M.C.; Data curation, S.L.-P., J.T., I.M., J.R.M., D.Z. and M.D.-A.; Formal analysis, K.S.d.G., I.A., M.D.-A. and M.C.; Funding acquisition, M.P., J.C. and M.C.; Investigation, K.S.d.G., M.T.R.-C., A.D., M.P. and M.C.; Methodology, K.S.d.G., M.T.R.-C., I.A., A.D. and M.C.; Project administration, M.P., J.C. and M.C.; Resources, M.P. and M.C.; Supervision, A.D., M.P., J.C. and M.C.; Validation, K.S.d.G., M.T.R.-C., M.P. and M.C.; Visualisation, K.S.d.G., M.T.R.-C., I.A. and M.C.; Writing—original draft, K.S.d.G., M.T.R.-C., I.A., A.D. and M.C.; Writing—review and editing, K.S.d.G., M.T.R.-C., I.A., S.L.-P., A.D., J.T., I.M., J.R.M., D.Z., M.D.-A., M.P., J.C. and M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria PI20/00863 awarded to M.C. and J.C., and PI19/01050 awarded to MP, and it was funded by Instituto de Salud Carlos III and Beca de la Marató de TV3 2020 (Beca la Marató—201932-30) awarded to MP. This research was also co-funded by the European Regional Development Fund / European Social Fund; “A way to make Europe” / “Investing in your future”. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the ethic and scientific committee of our institution (Ref. HCB 2012/7324). All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analysed in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We are indebted to the HCB-IDIBAPS Biobank, integrated in the Spanish National Biobanks Network, for the biological human samples and data procurement. We thank Sysmex Spain S.L. (Sant Just Desvern, Spain) for technical support. We acknowledge the support of Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC), sponsored by Pla Director d’Oncologia de Catalunya (PDO). We also acknowledge the support of the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. We thank Antonio Carrasco for his support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#)
2. Bullman, S.; Pedamallu, C.S.; Sicinska, E.; Clancy, T.E.; Zhang, X.; Cai, D.; Neuberger, D.; Huang, K.; Guevara, F.; Nelson, T.; et al. Analysis of Fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* **2017**, *358*, 1443–1448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Bailey, C.E.; Hu, C.Y.; You, Y.N.; Bednarski, B.K.; Rodriguez-Bigas, M.A.; Skibber, J.M.; Cantor, S.B.; Chang, G.J. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975–2010. *JAMA Surg.* **2015**, *150*, 17–22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Kerr, J.; Anderson, C.; Lippman, S.M. Physical Activity, Sedentary Behaviour, Diet and Cancer: An Update and Emerging New Evidence. *Lancet Oncol.* **2023**, *18*, E457–E471. [\[CrossRef\]](#)
5. Cubiella, J.; González, A.; Almazán, R.; Rodríguez-Camacho, E.; Fontenla Rodiles, J.; Domínguez Ferreiro, C.; Tejido Sandoval, C.; Sánchez Gómez, C.; de Vicente Bielza, N.; Lorenzo, I.P.-R.; et al. PT1 Colorectal Cancer Detected in a Colorectal Cancer Mass Screening Program: Treatment and Factors Associated with Residual and Extraluminal Disease. *Cancers* **2020**, *12*, 2530. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Argilés, G.; Tabernero, J.; Labianca, R.; Hochhauser, D.; Salazar, R.; Iveson, T.; Laurent-Puig, P.; Quirke, P.; Yoshino, T.; Taieb, J.; et al. Localised Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 1291–1305. [\[CrossRef\]](#)
7. Dykstra, M.A.; Gimon, T.I.; Ronsley, P.E.; Buie, W.D.; Maclean, A.R. Classic and Novel Histopathologic Risk Factors for Lymph Node Metastasis in T1 Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis. Colon Rectum* **2021**, *64*, 1139–1150. [\[CrossRef\]](#)
8. Yasue, C.; Chino, A.; Takamatsu, M.; Namikawa, K.; Ide, D.; Saito, S.; Igarashi, M.; Fujisaki, J. Pathological Risk Factors and Predictive Endoscopic Factors for Lymph Node Metastasis of T1 Colorectal Cancer: A Single-Center Study of 846 Lesions. *J. Gastroenterol.* **2019**, *54*, 708–717. [\[CrossRef\]](#)
9. Backes, Y.; Elias, S.G.; Groen, J.N.; Schwartz, M.P.; Wolfhagen, F.H.J.; Geesing, J.M.J.; Ter Borg, F.; van Bergeijk, J.; Spanier, B.W.M.; de Vos Tot Nederveen Cappel, W.H.; et al. Histologic Factors Associated With Need for Surgery in Patients With Pedunculated T1 Colorectal Carcinomas. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 1647–1659. [\[CrossRef\]](#)
10. Miyachi, H.; Kudo, S.; Mochizuki, K.; Kouyama, Y.; Ichimasa, K. Tumor Location and Patient Sex Are Novel Risk Factors of Lymph Node Metastasis in T1 Colorectal Cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *35*, 2292. [\[CrossRef\]](#)
11. Yamamoto, H.; Tomita, N.; Inomata, M.; Furuhashi, T.; Miyake, Y.; Noura, S.; Kato, T.; Murata, K.; Hayashi, S.; Igarashi, S.; et al. OSNA-Assisted Molecular Staging in Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial in Japan. *Ann. Surg. Oncol.* **2016**, *23*, 391–396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

12. Güller, U.; Zettl, A.; Worni, M.; Langer, I.; Cabalzar-Wondberg, D.; Viehl, C.T.; Demartines, N.; Zuber, M. Molecular Investigation of Lymph Nodes in Colon Cancer Patients Using One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA): A New Road to Better Staging? *Cancer* **2012**, *118*, 6039–6045. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Tsujimoto, M.; Nakabayashi, K.; Yoshidome, K.; Kaneko, T.; Iwase, T.; Akiyama, F.; Kato, Y.; Tsuda, H.; Ueda, S.; Sato, K.; et al. One-Step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4807–4816. [\[CrossRef\]](#)
14. Archilla, I.; Diaz-Mercedes, S.; Aguirre, J.J.; Tarragona, J.; Machado, I.; Rodrigo, M.T.; Lopez-Prades, S.; Gorostiaga, I.; Landolfi, S.; Alén, B.O.; et al. Lymph Node Tumor Burden Correlates With Tumor Budding and Poorly Differentiated Clusters: A New Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma? *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2021**, *12*, e00303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Rakislova, N.; Montironi, C.; Aldecoa, I.; Fernandez, E.; Bombi, J.A.; Jimeno, M.; Balaguer, F.; Pellise, M.; Castells, A.; Cuatrecasas, M. Lymph Node Pooling: A Feasible and Efficient Method of Lymph Node Molecular Staging in Colorectal Carcinoma. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 14. [\[CrossRef\]](#)
16. Barel, F.; Cariou, M.; Saliou, P.; Kermarrec, T.; Auffret, A.; Samaison, L.; Bourhis, A.; Badic, B.; Jézéquel, J.; Cholet, F.; et al. Histopathological Factors Help to Predict Lymph Node Metastases More Efficiently than Extra-Nodal Recurrences in Submucosa Invading PT1 Colorectal Cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8342. [\[CrossRef\]](#)
17. Oh, J.R.; Park, B.; Lee, S.; Han, K.S.; Youk, E.G.; Lee, D.H.; Kim, D.S.; Lee, D.S.; Hong, C.W.; Kim, B.C.; et al. Nomogram Development and External Validation for Predicting the Risk of Lymph Node Metastasis in T1 Colorectal Cancer. *Cancer Res. Treat.* **2019**, *51*, 1275–1284. [\[CrossRef\]](#)
18. Ueno, H.; Mochizuki, H.; Hashiguchi, Y.; Shimazaki, H.; Aida, S.; Hase, K.; Matsukuma, S.; Kanai, T.; Kurihara, H.; Ozawa, K.; et al. Risk Factors for an Adverse Outcome in Early Invasive Colorectal Carcinoma. *Gastroenterology* **2004**, *127*, 385–394. [\[CrossRef\]](#)
19. Ueno, H.; Kajiwara, Y.; Shimazaki, H.; Shinto, E.; Hashiguchi, Y.; Nakanishi, K.; Maekawa, K.; Katsurada, Y.; Nakamura, T.; Mochizuki, H.; et al. New Criteria for Histologic Grading of Colorectal Cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **2012**, *36*, 193–201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Lugli, A.; Kirsch, R.; Ajioka, Y.; Bosman, F.; Cathomas, G.; Dawson, H.; El Zimaity, H.; Fléjou, J.F.; Hansen, T.P.; Hartmann, A.; et al. Recommendations for Reporting Tumor Budding in Colorectal Cancer Based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod. Pathol.* **2017**, *30*, 1299–1311. [\[CrossRef\]](#)
21. Kikuchi, R.; Takano, M.; Takagi, K.; Fujimoto, N.; Nozaki, R.; Fujiyoshi, T.; Uchida, Y. Management of Early Invasive Colorectal Cancer. Risk of Recurrence and Clinical Guidelines. *Dis. Colon Rectum* **1995**, *38*, 1286–1295. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Haggitt, R.C.; Glotzbach, R.E.; Soffer, E.E.; Wruble, L.D. Prognostic Factors in Colorectal Carcinomas Arising in Adenomas: Implications for Lesions Removed by Endoscopic Polypectomy. *Gastroenterology* **1985**, *89*, 328–336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Davies, M.; Arumugam, P.J.; Shah, V.I.; Watkins, A.; Morgan, A.R.; Carr, N.D.; Beynon, J. The Clinical Significance of Lymph Node Micrometastasis in Stage I and Stage II Colorectal Cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 175–179. [\[CrossRef\]](#)
24. Rahbari, N.N.; Bork, U.; Motschall, E.; Thorlund, K.; Büchler, M.W.; Koch, M.; Weitz, J. Molecular Detection of Tumor Cells in Regional Lymph Nodes Is Associated with Disease Recurrence and Poor Survival in Node-Negative Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 60–70. [\[CrossRef\]](#)
25. Yamamoto, H. Micrometastasis in Lymph Nodes of Colorectal Cancer. *Ann. Gastroenterol. Surg.* **2022**, *6*, 466–473. [\[CrossRef\]](#)
26. Sloothaak, D.A.M.; Sahami, S.; Van Der Zaag-Loonen, H.J.; Van Der Zaag, E.S.; Tanis, P.J.; Bemelman, W.A.; Buskens, C.J. The Prognostic Value of Micrometastases and Isolated Tumour Cells in Histologically Negative Lymph Nodes of Patients with Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2014**, *40*, 263–269. [\[CrossRef\]](#)
27. Yamamoto, H.; Sekimoto, M.; Oya, M.; Yamamoto, N.; Konishi, F.; Sasaki, J.; Yamada, S.; Taniyama, K.; Tominaga, H.; Tsujimoto, M.; et al. OSNA-Based Novel Molecular Testing for Lymph Node Metastases in Colorectal Cancer Patients: Results from a Multicenter Clinical Performance Study in Japan. *Ann. Surg. Oncol.* **2011**, *18*, 1891–1898. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Hiyoshi, Y.; Akiyoshi, T.; Fukunaga, Y. The Advantage of One-Step Nucleic Acid Amplification for the Diagnosis of Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer Patients. *Ann. Gastroenterol. Surg.* **2021**, *5*, 60–66. [\[CrossRef\]](#)
29. Ichimasa, K.; Kudo, S.E.; Miyachi, H.; Kouyama, Y.; Misawa, M.; Mori, Y. Risk Stratification of T1 Colorectal Cancer Metastasis to Lymph Nodes: Current Status and Perspective. *Gut Liver* **2021**, *15*, 818–826. [\[CrossRef\]](#)
30. Kuo, E.; Wang, K.; Liu, X. A Focused Review on Advances in Risk Stratification of Malignant Polyps. *Gastroenterol. Res.* **2020**, *13*, 163–183. [\[CrossRef\]](#)
31. Aizawa, D.; Sugino, T.; Oishi, T.; Hotta, K.; Imai, K.; Shiomi, A.; Notsu, A.; Ikegami, M.; Shimoda, T. The Essential Problem of Over-Measuring the Depth of Submucosal Invasion in PT1 Colorectal Cancer. *Virchows Arch.* **2022**, *480*, 323–333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Zwager, L.W.; Bastiaansen, B.A.J.; Montazeri, N.S.M.; Hompes, R.; Barresi, V.; Ichimasa, K.; Kawachi, H.; Machado, I.; Masaki, T.; Sheng, W.; et al. Deep Submucosal Invasion Is Not an Independent Risk Factor for Lymph Node Metastasis in T1 Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Gastroenterology* **2022**, *163*, 174–189. [\[CrossRef\]](#)
33. Brockmoeller, S.; Toh, E.W.; Kouvidi, K.; Hepworth, S.; Morris, E.; Quirke, P. Improving the Management of Early Colorectal Cancers (ECRC) by Using Quantitative Markers to Predict Lymph Node Involvement and Thus the Need for Major Resection of PT1 Cancers. *J. Clin. Pathol.* **2022**, *75*, 545–550. [\[CrossRef\]](#)

34. Brown, I.; Zammit, A.P.; Bettington, M.; Cooper, C.; Gill, A.J.; Agoston, A.; Odze, R. Pathological Features Associated with Metastasis in Patients with Early Invasive (PT1) Colorectal Carcinoma in Colorectal Polyps. *Histopathology* **2023**, *83*, 591–606. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Kajiwar, Y.; Oka, S.; Tanaka, S.; Nakamura, T.; Saito, S.; Fukunaga, Y.; Takamatsu, M.; Kawachi, H.; Hotta, K.; Ikematsu, H.; et al. Nomogram as a Novel Predictive Tool for Lymph Node Metastasis in T1 Colorectal Cancer Treated with Endoscopic Resection: A Nationwide, Multicenter Study. *Gastrointest. Endosc.* **2023**, *97*, 1119–1128.e5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Tateishi, Y.; Nakanishi, Y.; Taniguchi, H.; Shimoda, T.; Umemura, S. Pathological Prognostic Factors Predicting Lymph Node Metastasis in Submucosal Invasive (T1) Colorectal Carcinoma. *Mod. Pathol.* **2010**, *23*, 1068–1072. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Beaton, C.; Twine, C.P.; Williams, G.L.; Radcliffe, A.G. Systematic Review and Meta-Analysis of Histopathological Factors Influencing the Risk of Lymph Node Metastasis in Early Colorectal Cancer. *Colorectal Dis.* **2013**, *15*, 788–797. [\[CrossRef\]](#)
38. Brockmoeller, S.F.; West, N.P. Predicting Systemic Spread in Early Colorectal Cancer: Can We Do Better? *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 2887–2897. [\[CrossRef\]](#)
39. Cappellesso, R.; Nicolè, L.; Zanco, F.; Lo Mele, M.; Fassina, A.; Ventura, L.; Rosa-Rizzotto, E.; Guido, E.; De Lazzari, F.; Pilati, P.; et al. Synchronous Nodal Metastatic Risk in Screening Detected and Endoscopically Removed PT1 Colorectal Cancers. *Pathol. Res. Pract.* **2020**, *216*, 152966. [\[CrossRef\]](#)
40. Dang, H.; Dekkers, N.; le Cessie, S.; van Hooft, J.E.; van Leerdam, M.E.; Oldenburg, P.P.; Flothuis, L.; Schoones, J.W.; Langers, A.M.J.; Hardwick, J.C.H.; et al. Risk and Time Pattern of Recurrences After Local Endoscopic Resection of T1 Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *20*, e298–e314. [\[CrossRef\]](#)
41. Barresi, V.; Branca, G.; Ieni, A.; Reggiani Bonetti, L.; Baron, L.; Mondello, S.; Tuccari, G. Poorly Differentiated Clusters (PDCs) as a Novel Histological Predictor of Nodal Metastases in PT1 Colorectal Cancer. *Virchows Arch.* **2014**, *464*, 655–662. [\[CrossRef\]](#)
42. Shivji, S.; Cyr, D.P.; Pun, C.; Duan, K.; Sari, A.; Tomin, R.; Ng, D.; Brar, A.; Zerhouni, S.; Kennedy, E.; et al. A Novel Combined Tumor Budding-Poorly Differentiated Clusters Grading System Predicts Recurrence and Survival in Stage I-III Colorectal Cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **2022**, *46*, 1340–1351. [\[CrossRef\]](#)
43. Shivji, S.; Conner, J.R.; Barresi, V.; Kirsch, R. Poorly Differentiated Clusters in Colorectal Cancer: A Current Review and Implications for Future Practice. *Histopathology* **2020**, *77*, 351–368. [\[CrossRef\]](#)
44. Hong, M.; Kim, J.W.; Shin, M.K.; Kim, B.C. Poorly Differentiated Clusters in Colorectal Adenocarcinomas Share Biological Similarities with Micropapillary Patterns as Well as Tumor Buds. *J. Korean Med. Sci.* **2017**, *32*, 1595–1602. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Haddad, T.S.; Lugli, A.; Aherne, S.; Barresi, V.; Terris, B.; Bokhorst, J.M.; Brockmoeller, S.F.; Cuatrecasas, M.; Simmer, F.; El-Zimaity, H.; et al. Improving Tumor Budding Reporting in Colorectal Cancer: A Delphi Consensus Study. *Virchows Arch.* **2021**, *479*, 459–469. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Kouyama, Y.; Kudo, S.; Miyachi, H.; Ichimasa, K.; Matsudaira, S.; Misawa, M.; Mori, Y.; Kudo, T.; Hayashi, T.; Wakamura, K.; et al. Risk Factors of Recurrence in T1 Colorectal Cancers Treated by Endoscopic Resection Alone or Surgical Resection with Lymph Node Dissection. *Int. J. Colorectal Dis.* **2018**, *33*, 1029–1038. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Ronnow, C.F.; Arthursson, V.; Toth, E.; Krarup, P.M.; Syk, I.; Thorlacius, H. Lymphovascular Infiltration, Not Depth of Invasion, Is the Critical Risk Factor of Metastases in Early Colorectal Cancer: Retrospective Population-Based Cohort Study on Prospectively Collected Data, Including Validation. *Ann. Surg.* **2022**, *275*, E148–E154. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Vocino Trucco, G.; Benazzo, G.M.; Ricci, A.A.; Mangherini, L.; Falco, E.; Gambella, A.; Bertero, L.; Cassoni, P. Low PD-L1 Expression in Immune Cells Predicts the Presence of Nodal Metastasis in Early Invasive (PT1) Colorectal Cancer: A Novel Tool to Tailor Surgical Treatment. *Histopathology* **2023**, *83*, 126–136. [\[CrossRef\]](#)
49. Liebig, C.; Ayala, G.; Wilks, J.; Verstovsek, G.; Liu, H.; Agarwal, N.; Berger, D.H.; Albo, D. Perineural Invasion Is an Independent Predictor of Outcome in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 5131–5137. [\[CrossRef\]](#)
50. Berg, K.B.; Telford, J.J.; Gentile, L.; Schaeffer, D.F. Re-Examining the 1-Mm Margin and Submucosal Depth of Invasion: A Review of 216 Malignant Colorectal Polyps. *Virchows Arch.* **2020**, *476*, 863–870. [\[CrossRef\]](#)
51. Yan, Y.; Liu, H.; Mao, K.; Zhang, M.; Zhou, Q.; Yu, W.; Shi, B.; Wang, J.; Xiao, Z. Novel Nomograms to Predict Lymph Node Metastasis and Liver Metastasis in Patients with Early Colon Carcinoma. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 193. [\[CrossRef\]](#)
52. Scott, N.; Cairns, A.; Prasad, P.; Rotimi, O.; West, N.P.; Sanni, L.; Rizig, M.; Sood, R.; Rembacken, B.J. Resection Margin Involvement after Endoscopic Excision of Malignant Colorectal Polyps: Definition of Margin Involvement and Its Impact upon Tumour Recurrence. *Histopathology* **2023**, *83*, 80–90. [\[CrossRef\]](#)
53. Bousis, D.; Verras, G.-I.; Bouchagier, K.; Antzoulas, A.; Panagiotopoulos, I.; Katinioti, A.; Kehagias, D.; Kaplanis, C.; Kotis, K.; Anagnostopoulos, C.-N.; et al. The Role of Deep Learning in Diagnosing Colorectal Cancer. *Gastroenterol. Rev.* **2023**, *18*, 266–273. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Chlorogiannis, D.D.; Verras, G.-I.; Tzelepi, V.; Chlorogiannis, A.; Apostolos, A.; Kotis, K.; Anagnostopoulos, C.-N.; Antzoulas, A.; Vailas, M.; Schizas, D.; et al. Tissue Classification and Diagnosis of Colorectal Cancer Histopathology Images Using Deep Learning Algorithms. Is the Time Ripe for Clinical Practice Implementation? *Gastroenterol. Rev.* **2023**, *18*. [\[CrossRef\]](#)
55. Skrede, O.-J.; De Raedt, S.; Kleppe, A.; Hveem, T.S.; Liestøl, K.; Maddison, J.; Askautrud, H.A.; Pradhan, M.; Nesheim, J.A.; Albrechtsen, F.; et al. Deep Learning for Prediction of Colorectal Cancer Outcome: A Discovery and Validation Study. *Lancet* **2020**, *395*, 350–360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

56. Kudo, S.; Ichimasa, K.; Villard, B.; Mori, Y.; Misawa, M.; Saito, S.; Hotta, K.; Saito, Y.; Matsuda, T.; Yamada, K.; et al. Artificial Intelligence System to Determine Risk of T1 Colorectal Cancer Metastasis to Lymph Node. *Gastroenterology* **2021**, *160*, 1075–1084.e2. [\[CrossRef\]](#)
57. Peg, V.; Sansano, I.; Vieites, B.; Bernet, L.; Cano, R.; Córdoba, A.; Sancho, M.; Martín, M.D.; Vilardell, F.; Cazorla, A.; et al. Role of Total Tumour Load of Sentinel Lymph Node on Survival in Early Breast Cancer Patients. *Breast* **2017**, *33*, 8–13. [\[CrossRef\]](#)
58. Espinosa-Bravo, M.; Sansano, I.; Pérez-Hoyos, S.; Ramos, M.; Sancho, M.; Xercavins, J.; Rubio, I.T.; Peg, V. Prediction of Non-Sentinel Lymph Node Metastasis in Early Breast Cancer by Assessing Total Tumoral Load in the Sentinel Lymph Node by Molecular Assay. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2013**, *39*, 766–773. [\[CrossRef\]](#)
59. Vieites, B.; López-García, M.; Martín-Salvago, M.D.; Ramírez-Tortosa, C.L.; Rezola, R.; Sancho, M.; López-Vilaró, L.; Vilardell, F.; Burgués, O.; Fernández-Rodríguez, B.; et al. Predictive and Prognostic Value of Total Tumor Load in Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients after Neoadjuvant Treatment Using One-Step Nucleic Acid Amplification: The NEOVATTL Study. *Clin. Transl. Oncol.* **2021**, *23*, 1377–1385. [\[CrossRef\]](#)
60. Weixler, B.; Teixeira da Cunha, S.; Warschkow, R.; Demartines, N.; Güller, U.; Zettl, A.; Vahrmeijer, A.; van de Velde, C.J.H.; Viehl, C.T.; Zuber, M. Molecular Lymph Node Staging with One-Step Nucleic Acid Amplification and Its Prognostic Value for Patients with Colon Cancer: The First Follow-up Study. *World J. Surg.* **2021**, *45*, 1526–1536. [\[CrossRef\]](#)
61. Tani, K.; Itabashi, M.; Okuya, K.; Okita, K.; Takemasa, I.; Tomita, N.; Ogawa, S.; Nagashima, Y.; Yamamoto, M. Feasibility of Pooled One-Step Nucleic Acid Amplification for Molecular Staging of Pathologically Node-Negative Colon Cancer: A Prospective Multicenter Study. *Ann. Surg. Oncol.* **2021**, *28*, 8804–8812. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Aldecoa, I.; Atares, B.; Tarragona, J.; Bernet, L.; Sardon, J.D.; Pereda, T.; Villar, C.; Mendez, M.C.; Gonzalez-Obeso, E.; Elorriaga, K.; et al. Molecularly Determined Total Tumour Load in Lymph Nodes of Stage I–II Colon Cancer Patients Correlates with High-Risk Factors. A Multicentre Prospective Study. *Virchows Arch.* **2016**, *469*, 385–394. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Diaz-Mercedes, S.; Archilla, I.; Lahoz, S.; Rodrigo-Calvo, M.T.; Lopez-Prades, S.; Tarragona, J.; Landolfi, S.; Concha, A.; Machado, I.; Maurel, J.; et al. Cytology Smears: An Enhanced Alternative Method for Colorectal Cancer PN Stage—A Multicentre Study. *Cancers* **2022**, *14*, 6072. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Rodrigo-Calvo, M.T.; Saez de Gordo, K.; Lopez-Prades, S.; Archilla, I.; Diaz, A.; Berrios, M.; Camps, J.; Musulen, E.; Cuatrecasas, M. Tumour Cell Seeding to Lymph Nodes from In Situ Colorectal Cancer. *Cancers* **2023**, *15*, 842. [\[CrossRef\]](#)
65. Crafa, F.; Vanella, S.; Catalano, O.A.; Pomykala, K.L.; Baiamonte, M. Role of One-Step Nucleic Acid Amplification in Colorectal Cancer Lymph Node Metastases Detection. *World J. Gastroenterol.* **2022**, *28*, 4019–4043. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Discusión

Discusión

El primer artículo de este trabajo es un nuevo estudio molecular que demuestra la presencia de células tumorales en los GLs regionales en el CCR *in situ*. En todos los casos, los GLs fueron negativos con el análisis de hematoxilina eosina H&E (pN0), y la presencia de bajas cantidades de carga tumoral total (CTT) en los GLs se detectó solo mediante el método molecular OSNA. También demostramos la presencia de vasos linfáticos en la lámina propia de todos los CCR *in situ* evaluados, por lo que las células tumorales presentes en los GLs de estos carcinomas, que no habían alcanzado la submucosa, lo hicieron mediante la invasión de vasos linfáticos presentes en la lámina propia.

Los CCR *in situ* son carcinomas no invasivos y se considera que tienen un riesgo limitado de metástasis de los GLs (132). Sin embargo, utilizando el análisis molecular con el método OSNA de los GLs, hemos demostrado la presencia de pequeñas cantidades de CTT en los GLs del 11/39 casos (28%) de los CCR pTis. La presencia de vasos linfáticos en la mucosa colónica se demostró previamente mediante un mecanismo de linfangiogénesis en condiciones inflamatorias y neoplásicas (78,82,132). En consecuencia, algunos estudios identificaron inesperadamente la diseminación metastásica en más del 1% de los llamados adenocarcinomas colorrectales "in situ" y reportaron sobre la capacidad de los CCR pTis de metastatizar en ganglios linfáticos. Asimismo, los casos reportados de invasión linfática de "CCR intramucoso" defienden que es biológica y clínicamente plausible que un pequeño porcentaje de CCR *in situ* adquiera la capacidad de diseminación en GL sin necesidad de invasión submucosa, ya que se sabe que el plexo linfático está presente justo encima y dentro de la muscular de la mucosa. Por lo tanto, afirman que los CCR "intramucosos" con alteración o invasión a través de la muscularis mucosa pueden infiltrar los vasos linfáticos

(133,134). Lewin et al. reportaron 15 carcinomas colorrectales “intramucosos” poco diferenciados originados en adenomas resecados endoscópicamente, de los cuales un caso desarrolló enfermedad metastásica y otro se asoció con enfermedad de Paget de la piel anal. Los otros 13 casos estaban vivos y sin enfermedad con una mediana de seguimiento de 13 meses (135). Shia et al. describió dos adenocarcinomas intramucosos, uno poco diferenciado con 8 ganglios linfáticos negativos que recidivó con metástasis a epiplón e hígado 17 meses después de la resección quirúrgica. El segundo se originó en un adenoma túbulovelloso con invasión linfática en la base de la mucosa, sin afectar la muscularis mucosa (136).

Nuestro trabajo es el primer estudio publicado que incluye una serie de muestras quirúrgicas de CCR *in situ* en las que la evaluación de los GLs se ha realizado tanto con H&E como con métodos moleculares, utilizando para ello el método OSNA. Es conocido que los GL de colon y recto son normalmente de pequeño tamaño, pero aún así pueden contener micrometástasis o células tumorales aisladas que son difíciles de identificar con H&E. En otro trabajo, Aldecoa et al. demostraron que los GLs que son más propensos a albergar células tumorales son aquellos del territorio linfático que drena el tumor, generalmente ubicados cerca del tumor (137).

Otro hallazgo interesante de nuestro trabajo es que todos los CCR *in situ* tenían al menos un vaso linfático en la lámina propia, demostrado con tinción inmunohistoquímica para D2-40. Todos nuestros casos estaban limitados a la mucosa, sin invasión de la muscularis mucosae, no mostraron características de alto grado y todos fueron pN0 por H&E. El hallazgo de CTT en los GLs del 28% de casos indica que los CCR *in situ* son capaces de infiltrar los vasos linfáticos intramucosos con más frecuencia de lo esperado, pudiendo sembrar algunas

células tumorales en los GLs regionales. Aunque con tinciones inmunohistoquímicas para citoqueratina no pudimos objetivar presencia de células tumorales dentro de los vasos linfáticos de la lámina propia de la mucosa en ninguno de los CCR *in situ*, nueve tumores tenían 'intra-tumoral budding (ITB), siete de ellos Bd1 y dos Bd2. Dado que los TB son una manifestación de la transición epitelio-mesénquima, que proporciona movilidad y capacidad de infiltración a las células epiteliales, hipotetizamos que la presencia de ITB es la explicación de cómo las células tumorales alcanzaron e infiltraron los vasos linfáticos. El resto de nuestros CCR *in situ*, 76,9% (30/39), tenían Bd0, es decir, ausencia total de gemación tumoral. En este sentido, Zlobec et al. demostró que los CCR pT1 con Bd0 son menos agresivos que los tumores con Bd1(66). En nuestra cohorte, el subgrupo de CCR *in situ* con Bd0 no tuvo menor número de vasos linfáticos ni menor CCT en los GLs. En la literatura revisada no existen estudios publicados de CCR pTis e ITB. En nuestro estudio no encontramos ninguna relación significativa entre el número de vasos linfáticos presentes en la mucosa, la presencia de ITB o cualquier otro factor clínico-patológico, ni con la positividad de OSNA.

Las CCT obtenidas fueron de entre 400 y 4270, que representan cargas tumorales bajas, que se traducen en una escasa cantidad de células tumorales. Las cantidades de CCT en los GL regionales de nuestra serie de CCR *in situ* no tuvo repercusión clínica. En este sentido, es importante destacar que se ha demostrado que la CTT se correlaciona con el pN, y que la cantidad de CTT en los GLs, tiene valor pronóstico. Yamamoto et al. demostró que el CTT aumenta con el aumento del estadio pN del CCR, obteniendo 1.550 copias/ μ L en los casos pN0, 24.050 copias/ μ L en los casos pN1 y 90.600 copias/ μ L en los casos pN2 (129). En un estudio reciente de nuestro grupo, Archilla et al. validaron estos resultados, con valores similares, encontrando 1.775 copias/ μ L en los CCR pN0,

49.413 copias/ μ L en los pN1 y 95.000 copias/ μ L en los pN2. De hecho, la estadificación ganglionar pN del TNM se basa en el número de GLs positivos, definidos como metástasis tumorales $\geq 0,2$ mm de tamaño. Debido a la alta sensibilidad de las pruebas moleculares para la valoración de GLs, los bajos valores de CTT probablemente corresponden a células tumorales aisladas (CTA) más que a metástasis genuinas. Estos resultados son presumiblemente confiables y, si se informan, corresponderían a pN0mol+, con detección de CTT en los GLs únicamente por medios moleculares. Nuestros resultados confirman que incluso en el CCR pN0, puede haber una pequeña cantidad de CTT en los GLs, pero muy probablemente sin consecuencias clínicas. Una explicación plausible para esto último es que la grasa mesocólica o mesorrectal, que contiene GLs regionales, se reseca con el procedimiento quirúrgico. Así, en una cirugía con intención curativa se realiza una linfadenectomía regional y con ella se eliminan las CTAs y pequeños grupos de células tumorales no detectadas con H&E, lo que justificaría que valores bajos de CTT puedan no tener consecuencias clínicas. Varios estudios han demostrado una mayor sensibilidad en la identificación de pequeñas cantidades de CTT, es decir, células tumorales aisladas o micro-metástasis con el uso del método OSNA(116,125,129). Las pruebas moleculares de GLs que utilizan métodos cuantitativos son muy útiles ya que brindan información sobre la cantidad de CTT dentro de los GLs, lo que puede guiar el manejo clínico del paciente. Además, nuestro grupo demostró el valor pronóstico de la CTT en el CCR, con valores de ≥ 6000 copias/ μ L asociados con una peor supervivencia general (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SSE) (113,138).

Dado que ninguno de nuestros casos presentó metástasis en GLs ni recidiva de la enfermedad, nuestros resultados podrían reforzar la posición actual de que el carcinoma *in situ* debe tratarse como si fuera una displasia de alto grado en lugar de un carcinoma invasivo. Además, la extirpación quirúrgica

de estas lesiones se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad de la cirugía, que oscila entre el 3 y el 20%(139). De hecho, los programas de detección del CCR han llevado a un aumento en la detección temprana del CCR, incluidos los tumores pTis, pT1 y pT2. Existen pocos estudios sobre la tasa de recurrencia de pTis, que se limitan a los carcinomas de recto, siendo del 2,6% a los cinco años y del 6,7% a los 10 años, y una incidencia acumulada de recurrencia sistémica del 0,8% a los 5 años (140). Incluso si los hallazgos de nuestro estudio pueden ser de relevancia científica, demuestran claramente que la siembra de células tumorales en los GLs ocurre en una etapa muy temprana del CCR y debe tenerse en cuenta.

Una limitación de nuestro primer estudio es que utilizamos la mitad del GL para el método OSNA y la otra mitad para el análisis H&E, lo que puede haber inducido a un sesgo de asignación de las células tumorales hacia uno u otro análisis. A pesar de eso, se identificó la presencia de CCT en la parte del GL utilizada para el análisis molecular. Otra limitación es que no hubo asociación estadística entre el TB y la densidad de los vasos linfáticos/mayor carga tumoral según OSNA u otras características clínico-patológicas. Dado el número de casos en nuestra cohorte, el análisis probablemente no tenga suficiente potencia estadística.

En el segundo artículo publicado, demostramos que utilizando el método OSNA para la evaluación de los GLs del CCR pT1 puede distinguir a aquellos pacientes que podrían presentar cierto riesgo de progresión. Este método molecular de alta sensibilidad de análisis de GLs permite identificar aquellos CCR pT1 capaces de sembrar células tumorales en GLs y separarlos de aquellos con GLs completamente negativos, por lo que permite optimizar el tratamiento clínico de los pacientes con CCR pT1. Además, se ha demostrado que los resultados cuantitativos de las CTT, evaluadas con el método OSNA, se asocian

con características clínico-patológicas relacionadas con metástasis de ganglios linfáticos, además de brindarnos información pronóstica, ya que se ha demostrado que una CTT de ≥ 6000 copias/ μ L se asocia a peores supervivencias general y libre de enfermedad (113). Por lo tanto, en este estudio, solo consideramos una CTT de ≥ 6000 copias/ μ L con posible relevancia clínica. Inicialmente las micrometástasis ganglionares en el CCR no tenían importancia clínica (123), pero un metaanálisis realizado por Rahbari et al. reveló que en pacientes pN0 con H&E, la detección de células tumorales en GLs regionales por cualquier método más sensible que la H&E, se asociaba a peores supervivencias global, libre de enfermedad y asociada a la enfermedad (104,107). Estos resultados fueron reforzados por otro metaanálisis de Slothaak et al. en el que fueron incluidos estudios que habían utilizado inmunohistoquímica para evaluar las metástasis de ganglios linfáticos, en ellos informaron que los pacientes con micrometástasis tenían un mayor riesgo de recidiva tumoral. Sin embargo, el hallazgo de células tumorales aisladas (CTA) no tuvo impacto en la supervivencia libre de enfermedad (105).

Un hallazgo relevante de nuestro estudio fue la mayor positividad de GLs detectada por OSNA (22 casos; 24,7%), que por H&E (7 casos; 7,9%). Los tres casos con CTT ≥ 6000 copias/ μ L también fueron positivos con H&E, lo que refleja la importancia y confiabilidad de los valores de CTT. Hubo dieciséis casos con ganglios negativos por H&E pero positivos con OSNA, con CTT <6000 copias/ μ L, lo que puede representar micrometástasis o CTA. La discordancia probablemente se explica debido al sesgo de localización del tumor, ya que una parte del ganglio linfático se utilizó para OSNA y la otra parte para la estadificación convencional con H&E, que analiza solo una sección central de 3 μ m del ganglio linfático (125,129).

Al analizar las características histológicas asociadas a las metástasis ganglionares con positividad en el ganglio tanto por H&E como por OSNA observamos una correlación entre ambas positivities, OSNA con CCT > 6000 copias/ μ L y positividad con H&E con el "tumor budding" (TB). Estos resultados concuerdan con los publicados por Archilla et al (110). El TB es un factor de riesgo independiente de metástasis ganglionares en el CCR pT1 (47,51,52,54,73,74,141–151), y las guías clínicas actuales recomiendan someterse a cirugía en casos con TB intermedio y alto (Bd2 y Bd3) (152). Los "Poorly Differentiated Clusters" (PDC) se consideran un factor de riesgo histológico de metástasis ganglionares en el CCR pT1(61,147). En nuestro estudio, encontramos que los PDC se asociaron con metástasis ganglionares, con una tendencia no estadísticamente significativa con las positivities de OSNA, probablemente debido al pequeño número de casos con una CTT > 6000 copias/ μ L. Se ha propuesto que tanto los TB como la PDC se evalúen juntas en una "puntuación combinada", ya que ambas pueden referirse al mismo fenómeno biológico de transición epitelial a mesenquimatosa, pero todavía existe cierta controversia entre los expertos (65,153–155). Además, también observamos que la presencia de invasión linfovascular (ILV) se asoció con metástasis ganglionares. Como es bien sabido, la presencia de ILV es un factor de riesgo significativo para metástasis ganglionares en el CCR pT1 (47,51,52,55,61,74,141–143,146–151,156–159).

No encontramos una asociación entre invasión peri-neural (IPN) y metástasis ganglionares con ninguno de los métodos de análisis de GL. Sin embargo, debemos considerar que el IPN es una característica que se encuentra con poca frecuencia en el CCR pT1. Sin embargo, se ha demostrado ampliamente la asociación entre metástasis ganglionares y IPN en estadios más avanzados del CCR, que también se relaciona con la supervivencia libre de enfermedad y global (52,65,104,105,141,142,144,146,148,158,160,161). Además, no encontramos

relación entre la metástasis ganglionar y la profundidad de la infiltración submucosa, cuando se analizó con cualquiera de los métodos. Esta característica se ha asociado con la metástasis ganglionar en varios estudios, pero se han considerado diferentes puntos de corte para la estratificación del riesgo de metástasis (47,51,52,54,55,73,74,141,143,144,146,148,149,151,158,162). En un metaanálisis reciente, Zwager et al. no mostró una asociación significativa entre metástasis ganglionares y la profundidad de la infiltración submucosa (73). En cuanto al grado histológico, se considera que un grado histológico alto confiere un mayor riesgo de metástasis ganglionares, como se informa consistentemente en la literatura (51,52,54,65,73,74,141–143,146,148,149,151,156–158,163,164), mientras que otros estudios no encontraron tal relación (55,147,150,154,159). En nuestro estudio no observamos asociación entre alto grado histológico y metástasis ganglionares. Finalmente, otra característica histológica que no encontramos relación con las metástasis ganglionares fue la alteración de la muscularis mucosa. Ha habido cierto debate sobre la importancia de la alteración completa de la muscularis mucosa. Mientras que algunos autores han demostrado su asociación con metástasis ganglionares, no sólo en pólipos pediculados, sino en todo tipo de pólipos, otros autores no han observado tal vínculo (51,143,144,147).

El significado de la cantidad de CTT es de suma importancia y, por tanto, está acorde con su significación clínica. De hecho, la CTT de los ganglios linfáticos centinela (GLCs) en el carcinoma de mama se asocia con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia general, y en el contexto intraoperatorio la CTT del GLC es un indicador del estado de los ganglios linfáticos no centinela, por lo que su valor es fundamental para decidir la necesidad de realizar linfadenectomía axilar (115,165). En este mismo contexto, recientemente se ha explorado el papel de la detección molecular de metástasis GL mediante OSNA

en pacientes con cáncer de mama que han recibido terapia neoadyuvante sistémica. Así, un TTL ≥ 15.000 copias/ μ L en el ganglio centinela se ha demostrado que es un factor predictivo de metástasis en ganglios no centinela, con un valor predictivo negativo (VPN) del 90,5%; mientras que un CTT ≥ 25.000 copias/ μ L se relaciona con una peor supervivencia libre de enfermedad (165).

Antes de la demostración del valor pronóstico de la CTT en el CCR, había algunas evidencias de que valores bajos de CTT ≥ 250 copias/ μ L, aunque considerados “positivos”, no correspondían a un sobreestadiaje del paciente y no se asociaban al pronóstico (166). Las tasas informadas de positividad y de sobreestadificación ganglionar utilizando OSNA en el CCR son variables entre los diferentes estudios. Así, Aldecoa et al. informaron que hasta el 51% de los pacientes pN0 con H&E tenían GL positivos para OSNA, mientras que Croner et al. encontró que era del 25,2%, Yamamoto et al. del 17,6%, y Tani et al. del 9,1 % (128,130). Algunos autores observaron inicialmente la asociación entre la CTT con características clínicopatológicas de alto riesgo, y observaron que el CCR pT1 tenía valores de CTT más bajos que los tumores con infiltración más profunda, encontrando una correlación entre el estadio, CTT y pT (127,130). En línea con esto, Yamamoto et al. mostró que la CTT estaba relacionada con el estadio pN con H&E, ya que los casos pN0 tenían una mediana de 1.500 copias/ μ L, mientras que aquellos con pN1 tenían 24.050 copias/ μ L y los casos pN2 tenían 90.600 copias/ μ L (129). Archilla et al. encontraron resultados similares, con un TTL medio en pN0 de 1.775 copias/ μ L, pN1 de 49.413 copias/ μ L y pN2 de 95.000 copias/ μ L (113). Sus resultados fueron validados por Díaz-Mercedes et al., observando una CTT media en pN0 de 433,6 copias/ μ L, pN1 de 35.782,6 copias/ μ L y pN2 de 144.651,8 copias/ μ L (113,129,167). En nuestro estudio, la carga tumoral en GL de CCR pT1 con pN0 por H&E tuvo una mediana de 990 copias/ μ L (media 1.540,6 copias/ μ L), y en los casos pN1 una mediana de 5.000 copias/ μ L (media 9.241 copias/ μ L).

Por lo tanto, un mensaje importante sobre el estado de GL es que cualquier positividad de OSNA no equivale a un sobreestadiaje del paciente y que los valores bajos de CTT pueden no tener ninguna consecuencia clínica. De hecho, la alta sensibilidad de OSNA puede detectar la siembra de células tumorales en GLs incluso en pTis CCR, como demostramos en el primer artículo de esta tesis doctoral, donde los valores de CTT por debajo de 6.000 copias/ μ L (rango de 400 a 4.270 copias/ μ L) no tuvieron significación clínica. Sugirieron que estos valores de CTT podrían representar la presencia de células tumorales aisladas (CTA) en GLs de pTis CRC (168). Sin embargo, el significado de la presencia de las CTA en el CCR sigue siendo controvertido. A la vista de estos resultados, sería interesante distinguir de forma fiable la importancia de las micrometástasis y las CTA evaluadas con el método OSNA.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones; la más determinante es que parte de los GLs fueron evaluados por H&E y parte por OSNA, que incorpora un sesgo intrínseco de localización de las metástasis ganglionares, siempre que la metástasis del tumor sea lo suficientemente pequeña como para estar contenida solo en una parte de los GLs. De hecho, es la explicación más plausible para nuestros casos discordantes. Esto podría resolverse enviando todo el GL para análisis molecular, como se hace en los GL del carcinoma de mama (116,125). De hecho, todos los estudios de OSNA en CCR hasta la fecha han utilizado metodologías similares, con parte del GL para H&E y parte para OSNA, lo que puede ser el motivo de falsos negativos y está limitando su aplicabilidad en la práctica clínica general (169). Tuvimos un 1,1% de falsos negativos, pero en algunos estudios alcanza hasta un 15,4% (130). A pesar de esta limitación, casi todos los estudios publicados han demostrado unos buenos resultados de la técnica OSNA, mostrando una alta sensibilidad (90,4%), especificidad (96,8%),

concordancia (96,0%), valor predictivo positivo (79,8%) y valor predictivo negativo (98,6%) (125,169). En este sentido, la estadificación ganglionar con OSNA en el CCR puede mejorarse y adquirir toda su importancia clínica e impacto en el CCR en estadios tempranos sólo si se realiza un análisis completo del tejido ganglionar. Sólo entonces se podrán validar los valores CTT. Al respecto, Díaz-Mercedes et al. logró realizar un paso intermedio al demostrar que las extensiones citológicas de los GLs podrían usarse para obtener la pN, lo que permite el uso de todo el tejido del ganglio para OSNA. De hecho, encontraron que las extensiones citológicas de los ganglios teñidos con inmunohistoquímica para CK19 tenían un rendimiento similar al del método OSNA para detectar positividad de GLs y eran más sensibles que la H&E ($p < 0,0001$) (167). Otra limitación a considerar de nuestro estudio fue el pequeño número de casos, ya que la recidiva de la enfermedad en el CCR pT1 es sólo del 3,3%, y la proporción de casos con metástasis y muerte por la enfermedad es aún menor, siendo del 1,6% y 1,7%, respectivamente (151). Por lo tanto, no podemos hacer ninguna afirmación sobre la implicación pronóstica del estado de los GLs evaluados con OSNA o con H&E. Por otro lado, cabe destacar otra desventaja menor que es el hecho de encontrar GLs localizados en la grasa muy cerca de la pared colorrectal. Es posible que estos GL no se disequen en fresco, por lo tanto, se evalúen únicamente mediante H&E, pero aun así contribuyen al estadio pN del paciente. De hecho, en uno de nuestros casos tenía metástasis en un GL adicional disecado después de la fijación con formol. Se pueden perder ganglios linfáticos en una disección en fresco, y todos los ganglios linfáticos disecados después de la fijación en formol deben evaluarse únicamente mediante H&E convencional y contribuir al estadio pN (128, 168). Este es el primer estudio de OSNA realizado en CCR pT1. Hemos demostrado que permite identificar pacientes con cierto riesgo de recidiva, lo que ayuda a optimizar su manejo clínico.

Conclusiones

Conclusiones

1. Los carcinomas colorrectales *in situ* contienen vasos linfáticos en la lámina propia.
2. Las células tumorales de los carcinomas colorrectales *in situ* infiltran los vasos linfáticos de la lámina propia y metastatizan a los ganglios linfáticos regionales en forma de células tumorales aisladas o en pequeños grupos.
3. El método *One Step Nucleic Acid Amplification* permite cuantificar la carga tumoral total presente en los ganglios linfáticos de los carcinomas colorrectales *in situ* y pT1.
4. La detección de cantidades pequeñas de cargas tumorales totales en ganglios linfáticos del carcinoma colorrectal *in situ* no tienen relevancia clínica ni representan un riesgo adicional para los pacientes.
5. Las cargas tumorales totales obtenidas por el método *One Step Nucleic Acid Amplification* proporcionan información valiosa para la toma de decisiones clínicas en carcinomas colorrectales *in situ* y pT1.
6. El análisis molecular de los ganglios linfáticos en pacientes con carcinoma colorrectal pT1 ofrece una visión más integral del estado ganglionar que el estudio histológico con tinción de hematoxilina y eosina.
7. Pacientes con una carga tumoral total igual o superior a 6000 copias/ μ L deberían considerarse candidatos para un seguimiento más riguroso y podrían beneficiarse de terapia adyuvante.

8. La evaluación de los ganglios linfáticos con la técnica *One Step Nucleic Acid Amplification* puede contribuir de manera significativa a un manejo clínico más adecuado de pacientes con carcinoma colorrectal en estadios pTis y pT1.

Bibliografía

Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int J Cancer.* 2016;139(11):2436–46.
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683–91.
4. GLOBOCAN 2020. International Agency for Research on Cancer - WHO [Internet]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/724-spain-factsheets.pdf>
5. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2020;146(4):1164–73.
6. Keum NN, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Vol. 16, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* Nature Research; 2019. p. 713–32.
7. Lynch HT, Shaw TG. Practical genetics of colorectal cancer. *Chin Clin Oncol* 2013;2(2):12.
8. Li D. Recent advances in colorectal cancer screening. *Chronic Diseases and Translational Medicine.* *Chronic Dis Transl Med* 2018 Sep 17;4(3):139–147.
9. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2044–58.
10. Sinicrope FA. Lynch Syndrome–Associated Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2018;379(8):764–73.
11. Ditonno I, Novielli D, Celiberto F, Rizzi S, Rendina M, Ierardi E, et al. Molecular Pathways of Carcinogenesis in Familial Adenomatous Polyposis, *International Journal of Molecular Sciences;* 2023;24(6):5687.
12. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2012 Jun;10(6):639–45.

13. Enea D, Lauwers G, Svrcek M. Conventional and non-conventional dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of Pathology*. 2023; 43(3):180–191.
14. Musulen E, Gené M, Cuatrecasas M, Amat I, Veiga JA, Fernández-Aceñero MJ, et al. Gastric metaplasia as a precursor of nonconventional dysplasia in inflammatory bowel disease. *Hum Pathol*. 2024;143:50–61.
15. Choi WT, Yozu M, Miller GC, Shih AR, Kumarasinghe P, Misdraji J, et al. Nonconventional dysplasia in patients with inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma: a multicenter clinicopathologic study. *Modern Pathology*. 2020;33(5):933–43.
16. Lee H, Rabinovitch PS, Mattis AN, Lauwers GY, Choi WT. Non-conventional dysplasia in inflammatory bowel disease is more frequently associated with advanced neoplasia and aneuploidy than conventional dysplasia. *Histopathology*. 2021;78:814–30.
17. Schreuders EH, Ruco A, Rabeneck L, Schoen RE, Sung JJY, Young GP, et al. Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut*. 2016;95(5):50-62
18. Keum NN, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Vol. 16, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Research; 2019. p. 713–32.
19. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, et al. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology*. 2020;159(1):335-349.e15.
20. Siegel RL, Soerjomataram I, Hayes RB, Bray F, Weber TK, Jemal A. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut* [Internet]. 2019;68:2179–85.
21. Wolf A, Fontham ET, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal Cancer Screening for Average-Risk Adults: 2018 Guideline Update From the American Cancer Society; 6 Independent retired physician and patient advocate. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* CA CANCER J CLIN. 2018;68:250–81.
22. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update. *Gastroenterol Hepatol*. 2018;41(9):585–96.

23. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(2):264–71.
24. Lansdorp-Vogelaar AI, von Karsa L, Lansdorp-Vogelaar I. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. *Medicine*. 2016;95(5):50-62
25. Monika Ferlitsch A, Moss A, Hassan C, Bhandari P, Dumonceau JM, Paspatis G, et al. Colorectal polypectomy and endoscopic mucosal resection (EMR): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. Ferlitsch Monika et al Colorectal polypectomy and Endoscopy. 2017;49:270–97.
26. Burón A, Grau J, Andreu M, Augé JM, Guayta-Escolies R, Barau M, et al. Colorectal Cancer Early Screening Program of Barcelona, Spain: Indicators of the first round of a program with participation of community pharmacies. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2015;145(4):141–6.
27. Williams JR, Ayscue JM. Colorectal cancer screening: A review of current screening options, timing, and guidelines. Vol. 127, *Journal of Surgical Oncology*. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 1236–46.
28. Chiang TH, Chuang SL, Chen SLS, Chiu HM, Yen AMF, Chiu SYH, et al. Difference in performance of fecal immunochemical tests with the same hemoglobin cutoff concentration in a nationwide colorectal cancer screening program. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1317–26.
29. Lin JS, Perdue LA, Henrikson NB, Bean SI, Blasi PR. Screening for Colorectal Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2021;325(19):1978–98.
30. Zhai RL, Xu F, Zhang P, Zhang WL, Wang H, Wang JL, et al. The Diagnostic Performance of Stool DNA Testing for Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine*. 2016;95(5):50-62
31. Ladabaum U, Mannalithara A. Comparative Effectiveness and Cost Effectiveness of a Multitarget Stool DNA Test to Screen for Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*. 2016;151(3):427-439.e6.
32. Shaukat A, Kahi CJ, Burke CA, Rabeneck L, Sauer BG, Rex DK. ACG Clinical Guidelines: Colorectal Cancer Screening 2021. *Am J Gastroenterol*. 2021;116(3):458–79.
33. Jung Y, Joo YE, Kim HG, Jeon SR, Cha JM, Yang HJ, et al. Relationship between the endoscopic withdrawal time and adenoma/polyp detection

- rate in individual colonic segments: a KASID multicenter study. *Gastrointest Endosc*. 2019;89(3):523–30.
34. Coghlan E, LaFerrere L, Zenon E, Marini JM, Rainero G, San Roman A, et al. Timed screening colonoscopy: a randomized trial of two colonoscopic withdrawal techniques. *Surg Endosc* [Internet]. 2020;34(3):1200–5.
 35. Fletcher JG, Silva AC, Fidler JL, Cernigliaro JG, Manduca A, Limburg PJ, et al. Noncathartic CT colonography: Image quality assessment and performance and in a screening cohort. *AJR Am J Roentgenol* [Internet]. 2013;201(4):787–94.
 36. Johnson CD, Manduca A, Fletcher JG, MacCarty RL, Carston MJ, Harmsen WS, et al. Noncathartic CT colonography with stool tagging: Performance with and without electronic stool subtraction. *American Journal of Roentgenology*. 2008;190(2):361–6.
 37. Zueco CZ, Sampedro CS, Corroto JD, Fernández PR, Fontanillo MF. CT colonography without cathartic preparation: Positive predictive value and patient experience in clinical practice. *Eur Radiol*. 2012;22(6):1195–204.
 38. Sieg A, Friedrich K, Sieg U. Is PillCam COLON capsule endoscopy ready for colorectal cancer screening a prospective feasibility study in a community gastroenterology practice. *American Journal of Gastroenterology*. 2009;104(4):848–54.
 39. Eliakim R, Fireman Z, Gralnek IM, Yassin K, Waterman M, Kopelman Y, et al. Evaluation of the PillCam Colon capsule in the detection of colonic pathology: Results of the first multicenter, prospective, comparative study. *Endoscopy*. 2006;38(10):963–70.
 40. González-Suárez B, Llach J. [The new generation of the Pillcam Colon Capsule: a non-invasive alternative in colorectal cancer screening?]. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;34(5):346–51.
 41. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* [Internet]. 2014;63(2):317–25.
 42. Nikolaou S, Qiu S, Fiorentino F, Rasheed S, Tekkis P, Kontovounisios C. Systematic review of blood diagnostic markers in colorectal cancer. *Tech Coloproctol*. 2018;22(7):481–98.
 43. Bosch S, Teerenstra S, De Wilt JW, Cunningham C, Nagtegaal I. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk

- factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy* [Internet]. 2013;45(10):827–34.
44. Song J, Yin H, Zhu Y, Fei S. Identification of Predictive Factors for Lymph Node Metastasis in pT1 Stage Colorectal Cancer Patients: A Retrospective Analysis Based on the Population Database. *Pathology and Oncology Research*. 2022;28.
 45. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2009;133(10):1539–51.
 46. Bretthauer M, Løberg M, Wieszczy P, Kalager M, Emilsson L, Garborg K, et al. Effect of Colonoscopy Screening on Risks of Colorectal Cancer and Related Death. *New England Journal of Medicine*. 2022;387(17):1547–56.
 47. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(2):385–94.
 48. Ishii M, Ota M, Saito S, Kinugasa Y, Akamoto S, Ito I. Lymphatic vessel invasion detected by monoclonal antibody D2-40 as a predictor of lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009;24(9):1069–74.
 49. Guo K, Feng Y, Yuan L, Wasan HS, Sun L, Shen M, et al. Risk factors and predictors of lymph nodes metastasis and distant metastasis in newly diagnosed T1 colorectal cancer. *Cancer Med*. 2020;9(14):5095–113.
 50. Yan W, Zhou H, Shi S, Lin J, Lin Q, Choi CI, et al. Article 699400 1 (2021) Association Between Chemotherapy and Survival in T1 Colon Cancer With Lymph Node Metastasis: A Propensity-Score Matched. *Analysis Front Oncol*. 2021;11:699400.
 51. Tateishi Y, Nakanishi Y, Taniguchi H, Shimoda T, Umemura S. Pathological prognostic factors predicting lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal carcinoma. *Modern Pathology*. 2010;23(8):1068–72.
 52. Ichimasa K, Kudo SE, Miyachi H, Kouyama Y, Misawa M, Mori Y. Risk stratification of T1 colorectal cancer metastasis to Lymph nodes: Current status and perspective. *Gut Liver*. 2021;15(6):818–26.
 53. Li Q, Wang G, Luo J, Li B, Chen W. Clinicopathological factors associated with synchronous distant metastasis and prognosis of stage T1 colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2021;11(1).

54. Brown I, Zammit AP, Bettington M, Cooper C, Gill AJ, Agoston A, et al. Pathological features associated with metastasis in patients with early invasive (pT1) colorectal carcinoma in colorectal polyps. *Histopathology*. 2023;83(4):591-606.
55. Oh JR, Park B, Lee S, Han KS, Youk EG, Lee DH, et al. Nomogram Development and External Validation for Predicting the Risk of Lymph Node Metastasis in T1 Colorectal Cancer. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*. 2019;51(4):1275–84.
56. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: Prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012;118(3):628–38.
57. Ose I, Levic K, Thygesen LC, Bulut O, Bisgaard T, Gögenur I, et al. Prediction of disease recurrence or residual disease after primary endoscopic resection of pT1 colorectal cancer-results from a large nationwide Danish study. *Int J Colorectal Dis*. 2023;38(1):274.
58. Brockmoeller SF, West NP. Predicting systemic spread in early colorectal cancer: Can we do better? *World J Gastroenterol*. 2019;25(23):2887–97.
59. Bosch S, Teerenstra S, De Wilt JW, Cunningham C, Nagtegaal I. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy*. 2013;45(10):827–34.
60. Song J, Yin H, Zhu Y, Fei S. Identification of Predictive Factors for Lymph Node Metastasis in pT1 Stage Colorectal Cancer Patients: A Retrospective Analysis Based on the Population Database. *Pathology and Oncology Research*. 2022;28;28.
61. Barresi V, Branca G, Ieni A, Reggiani Bonetti L, Baron L, Mondello S, et al. Poorly differentiated clusters (PDCs) as a novel histological predictor of nodal metastases in pT1 colorectal cancer. *Virchows Archiv*. 2014;464(6):655–62.
62. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology*. 2017;30(9):1299–311.
63. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Domati F, Tuccari G. Prognostic significance of grading based on the counting of poorly differentiated

- clusters in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Hum Pathol* [Internet]. 2015;46(11):1722–9.
64. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016;115(7):831–40.
 65. Haddad TS, Lugli A, Aherne S, Barresi V, Terris B, Bokhorst JM, et al. Improving tumor budding reporting in colorectal cancer: a Delphi consensus study. *Virchows Archiv*. 2021;479(3):459–69.
 66. Zlobec I, Bächli M, Galuppini F, Berger MD, Dawson HE, Nagtegaal ID, et al. Refining the ITBCC tumor budding scoring system with a “zero-budding” category in colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2021;479(6):1085–1090.
 67. Pai RK, Chen Y, Jakubowski MA, Shadrach BL, Plesec TP, Pai RK. Colorectal carcinomas with submucosal invasion (pT1): Analysis of histopathological and molecular factors predicting lymph node metastasis. *Modern Pathology*. 2017;1;30(1):113–22.
 68. Ueno H, Kajiura Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(2):193–201.
 69. Kikuchi R, Takano M, Takagi K, Fujimoto N, Nozaki R, Fujiyoshi T, et al. Management of early invasive colorectal cancer. Risk of recurrence and clinical guidelines. *Dis Colon Rectum*. 1995;38(12):1286–95.
 70. Yasue C, Chino A, Takamatsu M, Namikawa K, Ide D, Saito S, et al. Pathological risk factors and predictive endoscopic factors for lymph node metastasis of T1 colorectal cancer: a single-center study of 846 lesions. *J Gastroenterol*. 2019;54(8):708–17.
 71. Aarons CB, Shanmugan S, Bleier JIS. Management of malignant colon polyps: Current status and controversies. Vol. 20, *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press; 2014. p. 16178–83.
 72. Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE, Wruble LD. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology*. 1985;89(2):328–36.
 73. Zwager LW, Bastiaansen BAJ, Montazeri NSM, Hompes R, Barresi V, Ichimasa K, et al. Deep Submucosal Invasion Is Not an Independent Risk

- Factor for Lymph Node Metastasis in T1 Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2022;163(1):174–89.
74. Kajiwarra Y, Oka S, Tanaka S, Nakamura T, Saito S, Fukunaga Y, et al. Nomogram as a novel predictive tool for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer treated with endoscopic resection: a nationwide, multicenter study. *Gastrointest Endosc*. 2023;97(6):1119-1128.e5.
 75. Pigot F, Bouchard D, Mortaji M, Castinel A, Juguet F, Chaume JC, et al. Local excision of large rectal villous adenomas: long-term results. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(10):1345–50.
 76. Dumoulin FL, Hildenbrand R. Endoscopic resection techniques for colorectal neoplasia: Current developments. *World J Gastroenterol*. 2019;25(3):300–7.
 77. Hagen CE, Farooq A. Histologic evaluation of malignant polyps and low-stage colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(12):1450–4.
 78. Kenney BC, Jain D. Identification of lymphatics within the colonic lamina propria in inflammation and neoplasia using the monoclonal antibody D2-40. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2008;81(3):103–13.
 79. Cho T, Shiozawa E, Urushibara F, Arai N, Funaki T, Takehara Y, et al. The role of microvessel density, lymph node metastasis, and tumor size as prognostic factors of distant metastasis in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2017;13(6):4327–33.
 80. Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Modern Pathology*. 2006;19(10):1317–23.
 81. Pappas A, Lagoudianakis E, Seretis C, Koronakis N, Keramidaris D, Grapatsas K, et al. Role of lymphatic vessel density in colorectal cancer: Prognostic significance and clinicopathologic correlations. *Acta Gastroenterol Belg*. 2015;78(2):223–7.
 82. Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'dwyer ST, et al. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Disease*. 2007;9(9):793–800.
 83. Tomita T. Immunocytochemical localization of lymphatic and venous vessels in colonic polyps and adenomas. *Dig Dis Sci*. 2008;53(7):1880–5.
 84. Publishing Asia B, Hirakawa S. Association From tumor lymphangiogenesis to lymphovascular niche. *Cancer Sci*. 2009;100(6):983–9.

85. Gao J, Knutsen A, Arbman G, Carstensen J, Frånlund B, Sun XF. Clinical and biological significance of angiogenesis and lymphangiogenesis in colorectal cancer. *Digestive and Liver Disease*. 2009;41(2):116–22.
86. Liang P, Hong JW, Ubukata H, Liu HR, Watanabe Y, Katano M, et al. Increased density and diameter of lymphatic microvessels correlate with lymph node metastasis in early stage invasive colorectal carcinoma. *Virchows Archiv*. 2006;448(5):570–5.
87. Kaneko I, Tanaka S, Oka S, Kawamura T, Hiyama T, Ito M, et al. Lymphatic vessel density at the site of deepest penetration as a predictor of lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(1):13–21.
88. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology*. 2005 Jun;206(2):170–7.
89. Heindl LM, Hofmann TN, Adler W, Knorr HLJ, Holbach LM, Naumann GOH, et al. Intraocular Tumor-Associated Lymphangiogenesis. A Novel Prognostic Factor for Ciliary Body Melanomas with Extraocular Extension? *Ophthalmology*. 2010 Feb;117(2):334–42.
90. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol*. 2003;162(6):1951–60.
91. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;91(2):125–32.
92. Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Shibao K, et al. Lymphatic microvessel density is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(3):308–14.
93. Kawaura K, Fujii S, Murata Y, Hasebe T, Ishii G, Itoh T, et al. The lymphatic infiltration identified by D2-40 monoclonal antibody predicts lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal cancer. *Pathobiology*. 2007;74(6):328–35.
94. Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Shibao K, et al. Lymphatic microvessel density is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(3):308–14.

95. Kaneko I, Tanaka S, Oka S, Kawamura T, Hiyama T, Ito M, et al. Lymphatic vessel density at the site of deepest penetration as a predictor of lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(1):13–21.
96. Fenoglio CM, Kaye GI, Lane N. Distribution of Human Colonic Lymphatics in Normal, Hyperplastic, and Adenomatous Tissue: Its relationship to metastasis from small carcinomas in pedunculated adenomas, with two case reports. *Gastroenterology*. 1973;64(1):51–66.
97. Sacchi G, Weber E, Aglianó M, Lorenzoni P, Rossi A, Caruso AM, et al. Lymphatic vessels in colorectal cancer and their relation with inflammatory infiltrate. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(1):40–7.
98. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Laboratory Investigation*. 2002;82(9):1255–7.
99. Fogt F, Zimmerman RL, Ross HM, Daly T, Gausas RE. Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. *Oncol Rep*. 2004;11(1):47–50.
100. Rahier JF, De Beauce S, Dubuquoy L, Erdual E, Colombel JF, Jouret-Mourin - A, et al. Increased lymphatic vessel density and lymphangiogenesis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1996;84(1):55–66.
101. Rodrigo MT, Gordo KS De, Lopez-prades S, Archilla I, , Diaz A, Berrios M, et al. Tumour cell seeding to lymph nodes from in-situ colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(3):842.
102. Smith KJE, Jones PF, Burke DA, Treanor D, Finan PJ, Quirke P. Lymphatic vessel distribution in the mucosa and submucosa and potential implications for T1 Colorectal tumors. *Dis Colon Rectum*. 2011;54(1):35–40.
103. Zeyghami W, Zeyghami W, Uhre Hansen ML, Kronberg Jakobsen K, Groenhøj C, Feldt-Rasmussen U, et al. Endocrine-Related Cancer Liquid biopsies in thyroid cancers: a systematic review and meta-analysis. *Bioscientifica*. 2020;24(1):37–54.
104. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, Thorlund K, Büchler MW, Koch M, et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(1):60–70.

105. Bosch C, Rosello E, Alonso S, Almenar D, Grau E, Camarasa N, et al. Prognostic value of the detection of lymph node micrometastases in colon cancer. *Clin Transl Oncol*. 2008;10(9):572-8
106. Sloothaak DAM, van der Linden RLA, van de Velde CJH, Bemelman WA, Lips DJ, van der Linden JC, et al. Prognostic implications of occult nodal tumour cells in stage I and II colon cancer: The correlation between micrometastasis and disease recurrence. *European Journal of Surgical Oncology*. 2017;43(8):1456–62.
107. Yamamoto H. Micrometastasis in lymph nodes of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg*. 2022;6(4):466–73.
108. Yamamoto H, Tomita N, Inomata M, Furuhashi T, Miyake Y, Noura S, et al. OSNA-Assisted Molecular Staging in Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial in Japan. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(2):391–6.
109. Vogelaar F, Reimers M, Linden A, Smit M, Lips J, Velde H, et al. The diagnostic value of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for sentinel lymph nodes in colon cancer patients. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(12):3924-30.
110. Luna-Tomás MA, Solà-Suárez M, Mariscal-Martínez A, Castellà-Fernández E, Martínez-Román S, Pascual-Miguel I, et al. Is OSNA better than imprint cytology for intraoperative diagnosis of cancer involvement of axillary sentinel node in breast cancer? *Breast*. 2018;38:181–7.
111. Gonzalez O, Iglesias C, Zafon C, Castellvi J, Garcia-Burillo A, Temprana J, et al. Detection of thyroid papillary carcinoma lymph node metastases using one step nucleic acid amplification (OSNA): Preliminary results. *Journal of Investigative Surgery*. 2015;28(3):153–9.
112. Märkl B, Grosser B, Bauer K, Vlasenko D, Schenkirsch G, Probst A, et al. Ultrastaging Using Ex Vivo Sentinel Lymph Node Mapping and One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) in Gastric Cancer: Experiences of a European Center. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11).
113. Archilla I, Díaz-Mercedes S, Aguirre JJ, Tarragona J, Machado I, Rodrigo MT, et al. Lymph Node Tumor Burden Correlates With Tumor Budding and Poorly Differentiated Clusters: A New Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma? *Clin Transl Gastroenterol*. 2021;12(3):e00303.
114. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, De Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel

- lymph node: A new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(1):87–93.
115. Espinosa-Bravo M, Sansano I, Pérez-Hoyos S, Ramos M, Sancho M, Xercavins J, et al. Prediction of non-sentinel lymph node metastasis in early breast cancer by assessing total tumoral load in the sentinel lymph node by molecular assay. *European Journal of Surgical Oncology.* 2013;39(7):766–73.
 116. 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. *Clinical Cancer Research.* 2007;13(16):4807–16.
 117. Tamaki Y. One-step nucleic acid amplification assay (OSNA) for sentinel lymph node biopsy. *Breast Cancer.* 2015;22(3):230–4.
 118. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A, et al. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: A comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer.* 2011;117(19):4365–74.
 119. Rubio IT, Espinosa-Bravo M, Rodrigo M, Diaz MAV, Hardisson D, Sagasta A, et al. Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;147(2):371–80.
 120. Godey F, Leveque J, Tas P, Gandon G, Poree P, Mesbah H, et al. Sentinel lymph node analysis in breast cancer: contribution of one-step nucleic acid amplification (OSNA). *Breast Cancer Res Treat.* 2012;131(2):509–16.
 121. Castellano I, MacRì L, Deambrogio C, Balmativola D, Bussone R, Ala A, et al. Reliability of whole sentinel lymph node analysis by one-step nucleic acid amplification for intraoperative diagnosis of breast cancer metastases. *Ann Surg.* 2012;255(2):334–42.
 122. Chen SL, Bilchik AJ. More extensive nodal dissection improves survival for stages I to III of colon cancer: A population-based study. *Ann Surg.* 2006;244(4):602–8.
 123. Davies M, Arumugam PJ, Shah VI, Watkins A, Morgan AR, Carr ND, et al. The clinical significance of lymph node micrometastasis in stage I and stage II colorectal cancer. *Clinical and Translational Oncology.* 2008;10(3):175–9.

124. QUASAR Collaborative Group. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007;370(9604):2020–9.
125. Hiyoshi Y, Akiyoshi T, Fukunaga Y. The advantage of one-step nucleic acid amplification for the diagnosis of lymph node metastasis in colorectal cancer patients. Vol. 5, *Annals of Gastroenterological Surgery*. Blackwell Publishing Ltd; 2021;28(2):60–6.
126. Rakislova N, Montironi C, Aldecoa I, Fernandez E, Bombi JA, Jimeno M, et al. Lymph node pooling: A feasible and efficient method of lymph node molecular staging in colorectal carcinoma. *J Transl Med*. 2017;15(1):1–10.
127. Diaz-mercedes S, Aldecoa I, Bombi JA, Tarragona J, Gonzalez-farre B, Castillo P, et al. Molecular Lymph Node Total Tumor Load Correlates Better With High Risk Factors Than pN Stage in Early Colorectal Carcinoma . A Multicentre Study. 2017;2010.
128. Aldecoa I, Atares B, Tarragona J, Bernet L, Sardon JD, Pereda T, et al. Molecularly determined total tumour load in lymph nodes of stage I–II colon cancer patients correlates with high-risk factors. A multicentre prospective study. *Virchows Archiv*. 2016;469(4):385–94.
129. Yamamoto H, Sekimoto M, Oya M, Yamamoto N, Konishi F, Sasaki J, et al. OSNA-based novel molecular testing for lymph node metastases in colorectal cancer patients: Results from a multicenter clinical performance study in Japan. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(7):1891–8.
130. Tani K, Itabashi M, Okuya K, Okita K, Takemasa I, Tomita N, et al. Feasibility of Pooled One-Step Nucleic Acid Amplification for Molecular Staging of Pathologically Node-Negative Colon Cancer: A Prospective Multicenter Study. *Ann Surg Oncol*. 2021;28(13):8804–12.
131. Yamamoto N, Daito M, Hiyama K, Ding J, Nakabayashi K, Otomo Y, et al. An optimal mRNA marker for OSNA (one-step nucleic acid amplification) based lymph node metastasis detection in colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2013;43(3):264–70.
132. Hashimoto H, Horiuchi H, Kurata A, Kikuchi H, Okuyama R, Usui G, et al. Intramucosal colorectal carcinoma with lymphovascular invasion: clinicopathological characteristics of nine cases. *Histopathology*. 2019;74(7):1055–66.

133. Bracey T, Mathew J. Metastatic intramucosal colorectal adenocarcinoma: A case to support review of current concepts (and staging) of early colorectal cancer. *Histopathology*. 2015;66(6):906–7.
134. Lan YT, Yang SH, Li AFY, Lin JK. Conflicting finding on intramucosal colon cancers based on national survival outcomes data. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(27):2433.
135. Lewin MR, Fenton H, Burkart AL, Sheridan T, Abu-Alfa AK, Montgomery EA. Poorly differentiated colorectal carcinoma with invasion restricted to lamina propria (intramucosal carcinoma): A follow-up study of 15 cases. *American Journal of Surgical Pathology*. 2007;31(12):1882–6.
136. Shia J KD. Intramucosal poorly differentiated colorectal carcinoma: can it be managed conservatively? *Am J Surg Pathol*. 2020;32(10):1588–9.
137. Aldecoa I, Montironi C, Planell N, Pellise M, Fernandez-Esparrach G, Gines A, et al. Endoscopic tattooing of early colon carcinoma enhances detection of lymph nodes most prone to harbor tumor burden. *Surg Endosc*. 2017;31(2):723–33.
138. Itabashi M, Yamamoto H, Tomita N, Inomata M, Murata K, Hayashi S, et al. Lymph Node Positivity in One-Step Nucleic Acid Amplification is a Prognostic Factor for Postoperative Cancer Recurrence in Patients with Stage II Colorectal Cancer: A Prospective, Multicenter Study. *Ann Surg Oncol*. 2020;27(4):1077–83.
139. Vermeer NCA, Backes Y, Snijders HS, Bastiaannet E, Liefers GJ, Moons LMG, et al. National cohort study on postoperative risks after surgery for submucosal invasive colorectal cancer. 2018;75(8):545–59.
140. Oh BY, Yun HR, Kim SH, Yun SH, Kim HC, Lee WY, et al. Features of late recurrence following transanal local excision for early rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2015;58(11):1041–7.
141. Dykstra MA, Gimoni TI, Ronksley PE, Buie WD, Maclean AR. Classic and Novel Histopathologic Risk Factors for Lymph Node Metastasis in T1 Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2021;1139–50.
142. Barel F, Cariou M, Saliou P, Kermarrec T, Auffret A, Samaison L, et al. Histopathological factors help to predict lymph node metastases more efficiently than extra-nodal recurrences in submucosa invading pT1 colorectal cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–12.

143. Kuo E, Wang K, Liu X. A Focused Review on Advances in Risk Stratification of Malignant Polyps. *Gastroenterology Res.* 2020;13(5):163–83.
144. Aizawa D, Sugino T, Oishi T, Hotta K, Imai K, Shiomi A, et al. The essential problem of over-measuring the depth of submucosal invasion in pT1 colorectal cancer. *Virchows Archiv.* 2022;480(2):323–33.
145. Brockmoeller S, Toh EW, Kouvidi K, Hepworth S, Morris E, Quirke P. Improving the management of early colorectal cancers (eCRC) by using quantitative markers to predict lymph node involvement and thus the need for major resection of pT1 cancers. *J Clin Pathol.* 2022;75(8):545–50.
146. Beaton C, Twine CP, Williams GL, Radcliffe AG. Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Colorectal Disease.* 2013;15(7):788–97.
147. Backes Y, Elias SG, Groen JN, Schwartz MP, Wolfhagen FHJ, Geesing JMJ, et al. Histologic Factors Associated With Need for Surgery in Patients With Pedunculated T1 Colorectal Carcinomas. *Gastroenterology.* 2018;154(6):1647–59.
148. Brockmoeller SF, West NP. Predicting systemic spread in early colorectal cancer: Can we do better? *World J Gastroenterol.* 2019;25(23):2887–97.
149. Yasue C, Chino A, Takamatsu M, Namikawa K, Ide D, Saito S, et al. Pathological risk factors and predictive endoscopic factors for lymph node metastasis of T1 colorectal cancer: a single-center study of 846 lesions. *J Gastroenterol.* 2019;54(8):708–17.
150. Cappellesso R, Nicolè L, Zanco F, Lo Mele M, Fassina A, Ventura L, et al. Synchronous nodal metastatic risk in screening detected and endoscopically removed pT1 colorectal cancers. *Pathol Res Pract.* 2020;216(6):152966.
151. Dang H, Dekkers N, le Cessie S, van Hooft JE, van Leerdam ME, Oldenburg PP, et al. Risk and Time Pattern of Recurrences After Local Endoscopic Resection of T1 Colorectal Cancer: A Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2022;20(2):e298–314.
152. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2020;31(10):1291–305.

153. Shivji S, Cyr DP, Pun C, Duan K, Sari A, Tomin R, et al. A Novel Combined Tumor Budding-Poorly Differentiated Clusters Grading System Predicts Recurrence and Survival in Stage I-III Colorectal Cancer. *American Journal of Surgical Pathology*. 2022;46(10):1340–51.
154. Shivji S, Conner JR, Barresi V, Kirsch R. Poorly differentiated clusters in colorectal cancer: a current review and implications for future practice. *Histopathology*. 2020;77(3):351–68.
155. Hong M, Kim JW, Shin MK, Kim BC. Poorly differentiated clusters in colorectal adenocarcinomas share biological similarities with micropapillary patterns as well as tumor buds. *J Korean Med Sci*. 2017;32(10):1595–602.
156. Cubiella J, González A, Almazán R, Rodríguez-Camacho E, Rodiles JF, Ferreira CD, et al. Pt1 colorectal cancer detected in a colorectal cancer mass screening program: Treatment and factors associated with residual and extraluminal disease. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):1–19.
157. Kouyama Y, Kudo S ei, Miyachi H, Ichimasa K, Matsudaira S, Misawa M, et al. Risk factors of recurrence in T1 colorectal cancers treated by endoscopic resection alone or surgical resection with lymph node dissection. *Int J Colorectal Dis*. 2018;33(8):1029–38.
158. Ronnow CF, Arthursson V, Toth E, Krarup PM, Syk I, Thorlacius H. Lymphovascular Infiltration, Not Depth of Invasion, is the Critical Risk Factor of Metastases in Early Colorectal Cancer: Retrospective Population-based Cohort Study on Prospectively Collected Data, including Validation. *Ann Surg*. 2022;275(1):E148–54.
159. Vocino Trucco G, Benazzo GM, Ricci AA, Mangherini L, Falco E, Gambella A, et al. Low PD-L1 expression in immune cells predicts the presence of nodal metastasis in early invasive (pT1) colorectal cancer: a novel tool to tailor surgical treatment. *Histopathology*. 2023;83(1):126–36.
160. Miyachi H, Kudo S, Mochizuki K, Kouyama Y, Ichimasa K. Tumor location and patient sex are novel risk factors of lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2020;35(12):2292.
161. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5131–7.

162. Berg KB, Telford JJ, Gentile L, Schaeffer DF. Re-examining the 1-mm margin and submucosal depth of invasion: a review of 216 malignant colorectal polyps. *Virchows Archiv*. 2020;476(6):863–70.
163. Yan Y, Liu H, Mao K, Zhang M, Zhou Q, Yu W, et al. Novel nomograms to predict lymph node metastasis and liver metastasis in patients with early colon carcinoma. *J Transl Med*. 2019;17(1):1–16.
164. Scott N, Cairns A, Prasad P, Rotimi O, West NP, Sanni L, et al. Resection margin involvement after endoscopic excision of malignant colorectal polyps: definition of margin involvement and its impact upon tumour recurrence. *Histopathology*. 2023;83(1):80–90.
165. Vieites B, López-García M, Martín-Salvago MD, Ramirez-Tortosa CL, Rezola R, Sancho M, et al. Predictive and prognostic value of total tumor load in sentinel lymph nodes in breast cancer patients after neoadjuvant treatment using one-step nucleic acid amplification: the NEOVATTL study. *Clinical and Translational Oncology*. 2021;23(7):1377–85.
166. Weixler B, Teixeira da Cunha S, Warschkow R, Demartines N, Güller U, Zettl A, et al. Molecular Lymph Node Staging with One-Step Nucleic Acid Amplification and its Prognostic Value for Patients with Colon Cancer: The First Follow-up Study. *World J Surg*. 2021;45(5):1526–36.
167. Diaz-Mercedes S, Archilla I, Lahoz S, Rodrigo-Calvo MT, Lopez-Prades S, Tarragona J, et al. Cytology Smears: An Enhanced Alternative Method for Colorectal Cancer pN Stage—A Multicentre Study. *Cancers (Basel)*. 2022;14(24):1–15.
168. Crafa F, Vanella S, Catalano OA, Pomykala KL, Baiamonte M. Role of one-step nucleic acid amplification in colorectal cancer lymph node metastases detection. *World J Gastroenterol*. 2022;28(30):4019–43.