



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Estadía molecular ganglionar mediante OSNA en carcinoma colorrectal. Impacto económico y nuevas perspectivas

Sherley Diaz Mercedes



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

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

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



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA



Clínic
Barcelona



TESIS DOCTORAL

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Estadía molecular ganglionar mediante
OSNA en carcinoma colorrectal.
Impacto económico y nuevas perspectivas

Sherley Díaz Mercedes

Programa de Doctorado de Medicina e Investigación
Traslacional
Diciembre 03, 2024

Para Emily y Nicole que han sido el mejor regalo que me ha dado la vida

“La fortaleza no llega de la capacidad física. Llega de una voluntad indomable”

Mahatma Gandhi

“No importa lo lento que vayas, mientras no te detengas”

Confucio

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado de la perseverancia y resiliencia hacia un propósito. Deseo expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta tesis. Este ha sido un trayecto que ha derivado en varios caminos en los que he podido compartir con muchas personas, cada una de ellas ha dejado un poquito de sí que han contribuido a mi crecimiento personal y profesional, que al final me han conducido hacia la meta.

Agradezco enormemente al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic, que me han acogido como una más, aunque me haya formado en otro hospital. Pusieron toda su confianza en mí y me incentivaron a crecer a ser fuerte y a conseguir mis objetivos.

A mis directores de tesis, la Dra. Miriam Cuatrecasas, la persona que me ha instruido en cada paso de la creación de este trabajo, por sus grandes conocimientos en el área de la patología gastrointestinal y su clara visión a la hora de transmitir sus ideas y el Dr. Francesc Balaguer, por su ayuda incondicional, profesionalismo y grata actitud.

Al Dr. José Ramírez, por ser un buen mentor, por su gran entusiasmo y capacidad de impulsarte a ser mejor cada día, a seguir tus sueños y sobre todo a tener confianza en uno mismo.

A Leo y Adela, ya que más que mis compañeros de despacho han sido mis confidentes en las buenas y en las malas, me han ayudado mucho a superar todas las vicisitudes durante todo este proceso y a darme siempre unas palabras de aliento para poder sobrellevarlos.

Alba, Maite, Dani porque han sido el mejor equipo con el que tenido la oportunidad de trabajar, por animarme continuamente, gracias.

A David, mi esposo porque más que mi pareja es mi mejor amigo, mi confidente que siempre ha estado a mi lado dándome palabras de aliento e impulsándome a seguir adelante siempre.

!!!!!!!Muchas gracias a todos!!!!!!!!!!

FINANCIACIÓN

Esta investigación ha sido financiada con becas del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III del fondo de investigación sanitaria números referencias PI17/01304, PI20/00863, otorgados a Jordi Camps y Miriam Cuatrecasas.

Agradecemos el soporte técnico del Banc de tumors del IDIBAPS y el apoyo de la Xarxa de Banc de Tumors de Catalunya (XBTC). Agradecemos el soporte técnico de Sysmex España, S.L.

ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas y acrónimos

Introducción	27
1. Cáncer colorrectal: Distribución y prevalencia	27
1.1 Etiología y factores de riesgo	27
1.1.1 Factores personales	28
1.1.2 Factores medioambientales.....	28
1.1.3 Factores genéticos	29
1.2 Secuencia adenoma-carcinoma	30
1.2.1 Vías moleculares del desarrollo del carcinoma colorrectal.....	31
1.2.1.1 Vía de la inestabilidad cromosómica. CIN	31
1.2.1.2 Vía de la inestabilidad de microsatélites. MSI	34
1.2.1.3 Vía de la metilación de islas CpG. CIMP.....	36
1.3 Manejo terapéutico.....	37
2. Programas de cribado poblacional del carcinoma colorrectal.....	38
2.1 Colonoscopia y toma de muestras	40
2.2 Estudio histológico y estadificación patológica	42
2.2.1 Estadio tumoral-pT.....	44
2.2.2 Estadio ganglionar-pN	45
2.2.3 Diseminación a distancia / metástasis-pM	47
3. Estudios de extensión y seguimiento	48
3.1 Estudios de extensión	48
3.1.1 Pruebas de imagen	49
1.3.1.1 Tomografía Axial Computarizada (TAC)	49
1.3.1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	49
1.3.1.3 Tomografía con Emisión de Positrones (PET).....	49
3.2 Seguimiento del CCR	50
3.2.1 Biomarcadores en el seguimiento del CCR	53
3.2.1.1 Antígeno carcinoembrionario (CEA)	54
3.2.1.2 Biopsia líquida y miRNA	54
4. Técnicas moleculares para la estadificación ganglionar del CCR	56
4.1 Técnica OSNA: estudio molecular ganglionar y cuantificación del número de copias de ARNm de CK19.....	56

4.2 Estadificación ganglionar del CCR mediante OSNA	60
4.3 Análisis de los ganglios linfáticos mediante extensiones citológicas como método morfológico alternativo a la HE para establecer el estadio patológico ganglionar (pN) del CCR.....	62
4.3.1 Disección y procesamiento de los ganglios linfáticos	63
Hipótesis	67
Objetivos	71
Material, métodos y resultados	75
a) Estudio 1: Budget Impact Analysis of Molecular Lymph Node Staging Versus Conventional Histopathology Staging in Colorectal Carcinoma. Appl Health Econ Health Policy. 2019 Oct; 17 (5): 655-667. Doi: 10.1007/s40258-019-00482-7. PMID: 31115896; PMCID: PMC67488889.....	79
b) Estudio 1: Cytology Smears: An enhanced alternative method for colorectal cancer pN stage. A multicentre study. Cancers (Basel). 2022 Dec 9; 14(24):6072. Doi: 10.3390/cancers14246072. PMID: 36551559; PMCID: PMC9775901	97
Discusión general	117
Conclusiones	129
Bibliografía	133

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **CCR:** Carcinoma colorrectal
- **Q1:** Primer cuartil
- **Q2:** Segundo cuartil
- **pN:** Estadio patológico ganglionar
- **HE:** Hematoxilina y eosina
- **GL:** Ganglio linfático
- **AJCC:** American Joint Committee on Cancer
- **CAP:** Colegio Americano de Patólogos
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **ARNm:** Ácido Ribonucleico Mensajero
- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **CK19:** Citoqueratina 19
- **OSNA:** One Step Nucleic Acid Amplification
- **CTT:** Carga Tumoral Total
- **PCD:** Poorly Differentiated Clusters / Grupos pobremente diferenciados
- **SNS:** Sistema Nacional de Salud
- **GS:** Gold Standard
- **RT-LAMP:** Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification
- **CIN:** Inestabilidad Cromosómica
- **CIMP:** Fenotipo Metilador de Islas CpG
- **LOH:** Pérdida de Heterozigosidad
- **MSI:** Inestabilidad de Microsatélites
- **NICE:** National Institute for Health and Care Excellence
- **FFPE:** Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
- **WHO:** World Health Organization

TESIS EN FORMATO DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

La tesis consta de seis objetivos y dos estudios publicados

Estudio 1

Budget Impact Analysis of Molecular Lymph Node Staging Versus Conventional Histopathology Staging in Colorectal Carcinoma

Sherley Diaz-Mercedes, Ivan Archilla, Jordi Camps, Antonio de Lacy, Iñigo Gorostiaga, Dulce Momblan, Ainitze Ibarzabal, Joan Maurel, Nuria Chic, Josep Antoni Bombí, Francesc Balaguer, Antoni Castells, Iban Aldecoa, Josep Maria Borrás, Miriam Cuatrecasas

Applied Health Economics and Health Policy 2019; 17:655-667

Factor de impacto: 2.345

doi: 10.1007/s40258-019-00482-7

Health Policy & Medicine (Q1)

Estudio 2

Cytology smears: An enhanced alternative method for colorectal cancer pN stage. A multicentre study

Sherley Diaz-Mercedes, Ivan Archilla, Sara Lahoz, Maria Teresa Rodrigo-Calvo M.D, Sandra Lopez-Prades MSc, Jordi Tarragona, Stefania Landolfi, Angel Concha, Isidro Machado, Joan Maurel, Nuria Chic, Antoni Castells, Francesc Balaguer, Jordi Camps, Miriam Cuatrecasas

Journal of Cancers 2022; 14 (24), 6072

Factor de impacto: 6.575

doi: 10.3390/cancers14246072

Oncology (Q1)

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer colorrectal: Distribución y prevalencia

El cáncer colorrectal (CCR) constituye la segunda causa de mortalidad global por cáncer, siendo el tercero en prevalencia en los países occidentales, por detrás del cáncer de próstata y pulmón en hombres y del cáncer de mama y pulmón en mujeres (1). En España representa el segundo cáncer en incidencia.

La tasa de supervivencia global a los 5 años de los pacientes con CCR es del 65%, aunque es variable según el estadio del tumor, siendo del 80-90% en estadios I-II (localizados, sin afectación ganglionar ni metástasis a distancia), del 40 a 70% en estadio III (presencia de metástasis a los ganglios linfáticos), con una caída drástica del 10-15% en estadio IV (metástasis a distancia) (2).

Según la Sociedad Americana del Cáncer, se estima que para el 2024 se diagnosticaran aproximadamente 106,590 nuevos casos de cáncer de colon y 46,220 cánceres de recto (81,540 en hombres y 71,270 en mujeres). Se estima que a nivel mundial en el 2024 se produzcan 53,010 muertes (3). La mortalidad por CCR ha presentado una tendencia descendente en las últimas décadas, debido en gran parte a la introducción de los programas de cribado poblacional, los cuales han conseguido disminuir la mortalidad por CCR y ser efectivos al permitir el diagnóstico precoz y mejora de la supervivencia al proporcionar atención en la etapa más temprana posible de la enfermedad y, por lo tanto, es una estrategia importante de salud pública en todos los entornos (4,5).

1.1. Etiología y Factores de riesgo

El CCR es el resultado de un proceso de etiología multifactorial, en el que intervienen factores personales, medioambientales y genéticos. Afecta

aproximadamente al 15% de la población general en los países desarrollados. A nivel mundial, la probabilidad de padecer CCR a lo largo de la vida es de un 4-5%.

1.1.1. Factores personales

El CCR se asocia a múltiples factores de riesgo personales como la edad superior a 50 años, tener una enfermedad inflamatoria intestinal crónica (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), alcoholismo, tabaquismo, tipo de dieta-hábitos alimenticios no saludables, obesidad, falta de actividad física y antecedentes familiares de CCR (6).

1.1.2. Factores medioambientales

El CCR es quizás uno de los principales ejemplos de una enfermedad mediada por los factores medioambientales, lo que se evidencia por estudios sobre poblaciones migrantes que adquieren el riesgo de CCR de la población receptora en el plazo de una generación. Aunque las tasas de incidencia de CCR han disminuido en las dos últimas décadas debido al aumento de la detección precoz y resección de pólipos precancerosos en los programas de cribado poblacional, las tasas de incidencia del CCR han ido en aumento en menores de 50 años, lo que representa un signo de alarma. Por lo tanto, la identificación de los factores de riesgo ambientales es imperativa para proporcionar enfoques de intervención en poblaciones de alto riesgo (7).

Varios autores han recalcado la importante relación del microbioma intestinal con la carcinogénesis, debido a un desequilibrio bacteriano o disbiosis, como resultado de factores de virulencia, metabolitos bacterianos o vías inflamatorias (8). Asimismo, se han planteado hipótesis sobre la grasa dietética y su influencia sobre la flora bacteriana, indicando que puede tener un efecto sobre la patogénesis del cáncer de colon, teorizándose que las dietas

ricas en grasas promueven la carcinogénesis mediante la formación de ácido desoxicólico y ácido litocólico. La ingesta alta de grasas estimula la producción de ácidos biliares del hígado, que, tras el contacto con bacterias anaeróbicas en el colon, se deshidrogena para formar estos compuestos.

1.1.3. Factores genéticos

Dependiendo del tipo y origen de las mutaciones, los CCR pueden clasificarse en esporádicos, hereditarios y familiares no sindrómicos.

Los cánceres esporádicos representan aproximadamente el 75% de todos los CCR y se desarrollan en individuos de entre una mediana de 70-75 años de edad, que no portan ninguna mutación que les confiera susceptibilidad para desarrollar esta enfermedad ni vinculación familiar. Aunque el factor genético no es absoluto, pueden derivar de mutaciones puntuales, alteraciones genéticas o epigenéticas que conlleven una secuencia morfológica específica, siendo los adenomas las lesiones premalignas con capacidad de progresión a carcinomas invasivos (9).

Los CCR hereditarios, representan aproximadamente el 5% de los CCR. Están causados por la herencia de una alteración genética en línea germinal, generalmente una mutación de un gen relacionado con el proceso de carcinogénesis colorrectal. Los más frecuentes son la poliposis adenomatosa familiar (PAF) con mutaciones en el gen *APC* y el síndrome de Lynch con mutaciones en alguno de los genes reparadores del ADN (*MHL1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*). Existen muchos otros genes implicados en el desarrollo del CCR como el gen *MUTYH* (poliposis asociada a *MUTYH*), *NTHL1* (poliposis asociada a *NTHL1*), *POLE*, *POLD1* (poliposis asociada a la corrección de polímeros), *GREM1* (síndrome de poliposis hereditaria mixta), *MSH3* (poliposis asociada a *MSH3*), *AXIN2* (poliposis asociada a *AXIN2*), *SMAD4* / *BMPR1A* (síndrome de

poliposis juvenil), *STK11* (síndrome de Peutz-Jeghers), *PTEN* (síndrome de Cowden y relacionados), o *TP53* (síndrome de Li-Fraumeni), entre otros.

El CCR familiar representa aproximadamente el 20% de los CCR, se distingue de los síndromes hereditarios es una afección diversa que incluye pacientes con síndromes hereditarios no reconocidos y/o con formas aparentemente esporádicas con agregación familiar. Estos pacientes no tienen reconocido ningún mecanismo molecular, por lo que se les atribuye una combinación de factores medioambientales y genéticos-hereditarios (alteraciones con baja penetrancia) (10).

1.2. Secuencia adenoma- carcinoma

El CCR es una enfermedad heterogénea que se produce por la acumulación progresiva y secuencial en varios pasos de alteraciones genéticas y epigenéticas en genes reguladores del crecimiento y proliferación celular que son claves para marcar la transición de la mucosa colónica normal hacia un epitelio proliferativo en un periodo de aproximadamente 10-15 años (11,12).

La mayoría de los CCR se originan en lesiones precursoras, o pólipos precancerosos, divididos a grandes rasgos en adenomas tubulares (AT), adenomas tubulovelloso (ATV) y lesiones serradas (LS), con potencial de progresar y desarrollar un CCR infiltrante. Las alteraciones genéticas ocurren en oncogenes, genes supresores tumorales, genes relacionados con los mecanismos de reparación del ADN, o ser alteraciones epigenéticas como la hipermetilación del promotor de genes relacionados en procesos de carcinogénesis. La vía de señalización más comúnmente afectada es la Wntless/Wnt que regula la homeostasis y la reparación tisular, con mutaciones en *APC*, *K-RAS*, elementos de la vía de señalización de *TGF-β* (*TGFBR2* y *SMAD4*) y posteriormente mutaciones en *TP53* (13).

1.2.1. Vías moleculares del desarrollo del carcinoma colorrectal

Además de los factores personales y ambientales que influyen en el desarrollo del CCR, las alteraciones genéticas son un factor crucial en el desarrollo tumoral. Existen tres vías moleculares principales distintas en la patogénesis y desarrollo del CCR: vía de Inestabilidad Cromosómica (CIN), vía de Inestabilidad de Microsatélites (MSI) y vía de fenotipo metilador de islas CpG (CIMP).

1.2.1.1. Vía de la Inestabilidad Cromosómica. CIN

La vía CIN es la considerada como clásica y está implicada en el desarrollo del 65-70% de los casos esporádicos de CCR. En esta vía se produce un desbalance cromosómico, lo que conduce a la aparición de aneuploidías y pérdida de heterocigosidad (LOH). Resulta en defectos en la segregación cromosómica, estabilidad telomérica y respuesta al daño del ADN, lo que promueve la carcinogénesis a través de mutaciones puntuales en genes supresores y protooncogenes, o por el aumento del número de copias de dichos genes.

Las anomalías genómicas más frecuentes se encuentran en los genes supresores de tumores *APC* y *TP53*, mutaciones activadoras en *KRAS* y la subunidad alfa de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfonato 3-quinasa catalítica (*PIK3CA*). Según varios modelos genéticos, el primer paso incluye una mutación somática en *APC* (primer golpe), seguido de inactivación de *APC* y activación de *β-catenina* (segundo golpe) y posteriormente mutaciones oncogénicas en *KRAS* en la etapa adenomatosa, a la que se añade la delección del cromosoma 18q y la inactivación de *TP53* que ocurre durante la transición hacia malignidad. Además, las aberraciones genéticas en *TGF-βR* y *PI3KCA* están involucradas en el modelo de secuencia hacia el desarrollo de adenocarcinoma (**Figura 1**).

Vía de inestabilidad cromosómica (CIN)

Secuencia adenoma-carcinoma

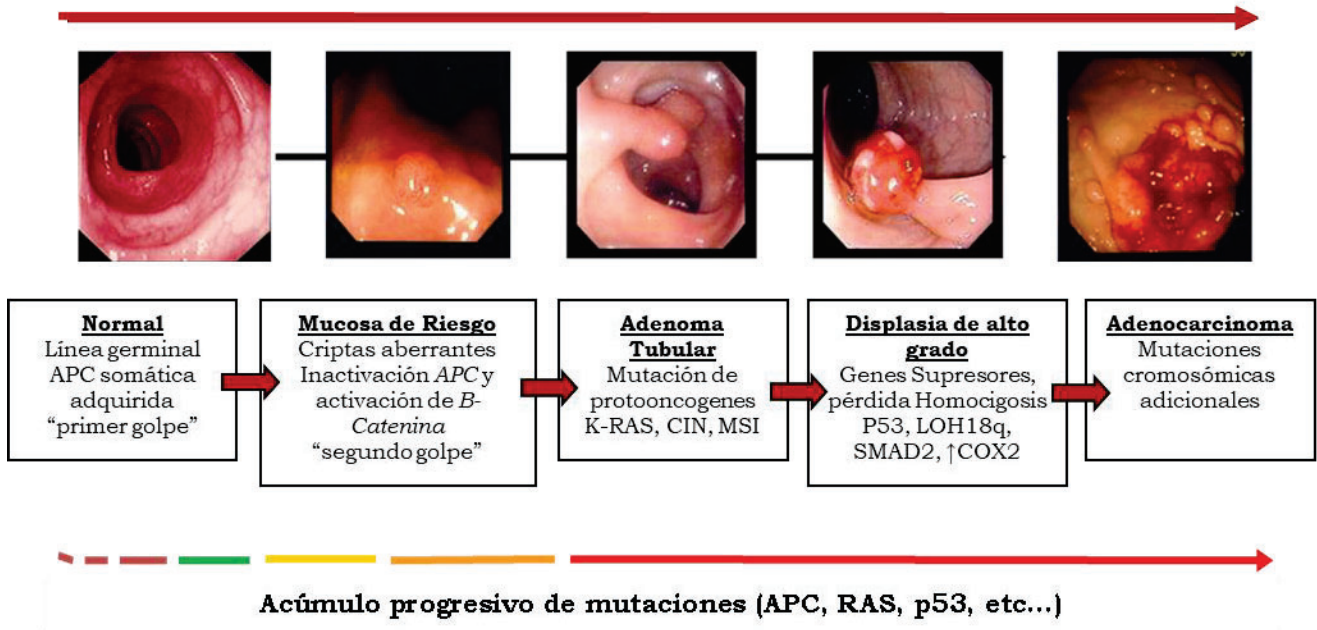


Figura 1: Secuencia adenoma-carcinoma de la carcinogénesis colorrectal. Imagen cedida por Mirian Cuatrecasas Freixas.

El gen de APC se localiza en el cromosoma 5q21-q22 e inhibe la transición de la fase G0/G1 a la fase S del ciclo celular. La vía de señalización Wnt mantiene las células madre indiferenciadas en la base de las criptas colónicas, lo que permite la supervivencia de células madre tanto normales como cancerosas.

β-catenina es el principal controlador de la vía de señalización Wnt y está presente en las etapas iniciales del desarrollo tumoral, siendo la mutación de *APC* la más frecuentemente observada en los AT y ATV. Tanto en los CCR familiares como en los esporádicos, la vía APC/*β-catenina*/Wnt-TCF4 juega un papel muy importante en el inicio y la progresión de la carcinogénesis.

La proteína *APC wild-type* controla negativamente la señalización de Wnt al regular el proteasoma mediado por ubiquitina y degrada de factor de transcripción β -catenina. La interrupción de la proteína *APC* da como resultado una señalización mejorada de Wnt mediante la estabilización de la β -catenina intracelular, que estimula la transcripción de genes dirigidos a Wnt y mejora los objetivos de TCF4 con un aumento en el crecimiento celular, diferenciación, propagación y adhesión de las células epiteliales colorrectales. Las mutaciones en los genes implicados en la vía APC/ β -catenina/TCF4 en células tumorales sin mutaciones de *APC* también están presentes en tumores CIN esporádicos.

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) está causada por mutaciones en *APC*, con un patrón de herencia autosómico dominante, siendo *APC* también la causa del síndrome de poliposis adenomatosa atenuada, síndrome de Gardner, y síndrome de Turcot, todos ellos caracterizados por la presencia de múltiples pólipos adenomatosos a nivel del tracto gastrointestinal. Las variantes de línea germinal bialélicas en el gen de la glicosilasa de ADN *MUTYH*, codifica una proteína de reparación por escisión de bases, lo que conlleva a la aparición de poliposis asociadas a *MUTYH*. Estos tipos de adenomas de colon, también pueden tener mutaciones en *APC*.

El gen *KRAS*, localizado en el brazo corto del cromosoma 12 (12p12.1), es un elemento clave de la vía de señalización MAPKinasa. Las mutaciones activadoras en *KRAS* a menudo surgen después de las mutaciones en *APC* y se encuentran en un 40% de los CCR. La vía de señalización MAPKinasa contiene varios factores de crecimiento, incluido el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En esta vía, la activación de *KRAS* resulta en la co-activación constitutiva de Raf-MEK-extracelular, vía de la quinasa regulada por señales (ERK), fosfoinositida 3 señalización de quinasa (PI3K) a través de MTOR y el factor de transcripción nuclear NF-Kb. La activación de esta vía es frecuente en muchos otros tipos de carcinomas, además del CCR.

Las mutaciones en esta vía tienen gran trascendencia por ser el objetivo de múltiples dianas terapéuticas, especialmente en pacientes con tumores metastásicos.

El gen *TP53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), codifica un factor de transcripción nuclear de 43.7 kDa. Su producto, P53, regula la transcripción de genes que regulan la reparación del ADN y las respuestas celulares a estrés oxidativo. Codifica proteínas que regulan el ciclo celular, la senescencia y la apoptosis. Las alteraciones de *TP53* conllevan a una pérdida de función del gen y se observan con mayor frecuencia en CCR avanzados que en adenomas, aunque tengan focos microscópicos de invasión o ya sean pT1. Esta asociación entre la frecuencia de las mutaciones de *TP53* y el estadio tumoral indican que las formas mutantes de *TP53* promueven el desarrollo de tumores en una etapa tardía de la tumorigénesis CCR, observándose en aproximadamente en el 50-75% de los CCR metastáticos.

La pérdida de Heterocigosidad (LOH), se refiere a la ausencia de una de las dos copias o alelos de un gen, con el alelo restante frecuentemente afectado por una mutación. Es un mecanismo observado con frecuencia en los CCR, sobre todo en los genes *TGFB-b*, *SMAD2* y *SMAD4*. Se observa en más del 70% de los CCR, sobre todo estadios avanzados y se relaciona con peor supervivencia global.

1.2.1.2. Vía de Inestabilidad de Microsatélites. MSI

La vía de Inestabilidad de Microsatélites, MSI es la vía molecular responsable de aproximadamente un 8-15% de CCR esporádicos y del síndrome de Lynch. La pérdida de expresión de estos genes puede aparecer de forma esporádica o por mutaciones en línea germinal como en el Síndrome de Lynch. Está producida por una hipermutación fenotípica debido a la pérdida de función de las proteínas reparadoras del ADN (MLH-1, MSH2, PMS2 y MSH6). Los

tumores que se desarrollan por esta vía suelen tener en general mejor pronóstico (**Figura 2**).

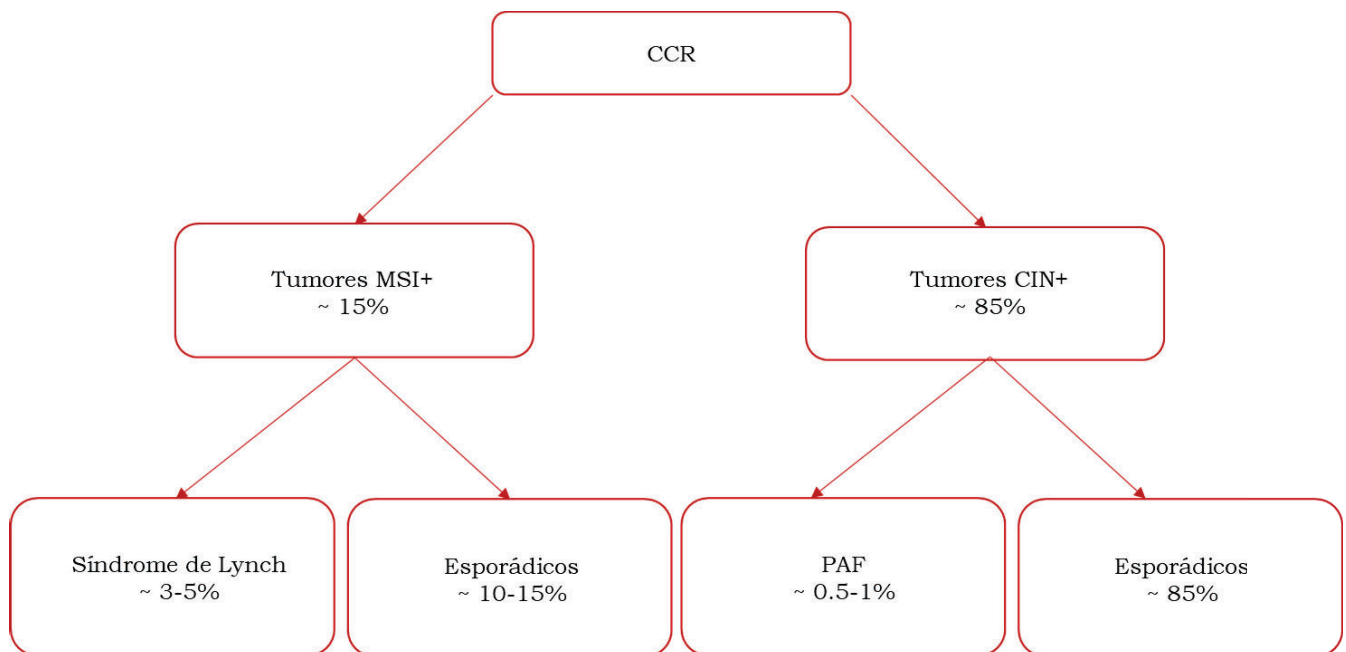


Figura 2: Carcinoma colorrectal: Inestabilidad Cromosómica (CIN) e Inestabilidad de Microsatélites (MSI). Autoría: Sherley Diaz Mercedes

Los CCR esporádicos con fenotipo MSI son debidos al silenciamiento epigenético del gen *MLH1* a través de hipermetilación de su promotor, o bien por inactivación somática de los dos alelos por mutaciones o pérdida de heterocigosidad.

Los CCR con MSI debidos a hipermetilación de *MLH1* también tienen una mayor frecuencia de mutación en *BRAF* que codifica una sustitución de V a E en el aminoácido 600 (*BRAFV^{600E}*), así como la presencia de una baja frecuencia de mutaciones en *APC* y *TP53* en comparación con los CCR que se desarrollan a través de la vía CIN.

Los tumores MSI, en especial los que contienen altos niveles de MSI (MSI-H) se desarrollan con mayor rapidez que los CCR de la vía CIN, atribuido al entorno hipermutador.

1.2.1.3. Vía de metilación de islas CpG. CIMP

La vía de inestabilidad epigenética se caracteriza por una amplia hipermetilación de las regiones de islas CpG de genes supresores tumorales y otros genes relacionados con cáncer, que provocan silenciamiento del gen, sin que esté presente ninguna mutación o alteración genética. La metilación del ADN es un proceso enzimático que agrega un grupo metilo a la posición 5 de la citosina mediante las ADN metiltransferasas (DNMT) para producir 5-metilcitosina. Por lo general, el sustrato favorito para DNMT es una secuencia de dinucleótidos CG, que por lo tanto se ha denominado CpG. Las islas CpG son tramos cortos de regiones ricas en CpG que a menudo se correlacionan con la región promotora de los genes. La metilación de las islas CpG dentro de la región promotora provoca el silenciamiento transcripcional, aunque parece que la disminución de la expresión génica solo es típica de un subgrupo de genes metilados en el CCR. La metilación que ocurre en los sitios CpG fuera del sitio del promotor, llamada metilación del cuerpo del gen, puede causar activación transcripcional (14,15).

La vía de metilación de islas CpG se observa en aproximadamente un 20-30% de los CCR y se asocia a una alta tasa de mutaciones en *KRAS* o *BRAF*, siendo *TP53 wild type*. Suelen localizarse en colon proximal, de histología mucinosa y poco diferenciados, en pacientes de mayor edad, sexo femenino y se asocian a peor pronóstico. Los CCR con fenotipo MSI generalmente tienen altos niveles de metilación en las regiones reguladoras en todo el genoma, incluido el fenotipo metilador de citosina/guanina (CpG) y el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP).

Según el número de marcadores metilados, el fenotipo CIMP también se puede dividir en CIMP-alto y CIMP-bajo. Los CCR CIMP-alto se asocian a mutaciones en *BRAF* y a peor pronóstico, especialmente si son MSS. Los CCR CIMP-bajo tienen peor pronóstico que los tumores CIMP-negativos.

Es importante destacar que las mutaciones *BRAF* V600E se encuentran con frecuencia en los casos de CCR asociadas a lesiones serradas sésiles y no así en los adenomas convencionales. La mutación *BRAF* es un evento temprano en la vía serrada y su expresión forzada conduce a un estado de letargo conocido como senescencia. Las mutaciones de *BRAF* se encuentran desde las lesiones tempranas serradas como los pólipos hiperplásicos o en lesiones avanzadas de lesiones serradas con displasia, lo que confirma el rol de esta mutación en la vía de progresión tumoral. Las mutaciones *BRAF* y *KRAS* son, en principio, mutuamente excluyentes.

1.3. Manejo terapéutico

El tratamiento de elección del CCR localizado, no metastático (estadios I, II o III), es la exéresis quirúrgica con linfadenectomía en bloque. Tras ello, según el estadio patológico del tumor y el estado de los ganglios linfáticos, algunos pacientes recibirán terapia adyuvante, consistente en diferentes regímenes de quimioterapia que pueden incluir o no terapias biológicas, siguiendo las guías de la NCCN (16) **(Figura 3)**.

En caso de que el CCR se localice en un pólipo pediculado o sésil, que haya sido resecado endoscópicamente de manera completa con márgenes libres, que presente una histología favorable sin factores de alto riesgo de metástasis ganglionar o progresión tumoral, se puede considerar que el tratamiento endoscópico es suficiente y recomendar únicamente un seguimiento endoscópico (17,18).

Los pacientes con carcinoma rectal que presentan infiltración grasa (T3) reciben quimioterapia y/o radioterapia neoadyuvante seguida de la exéresis quirúrgica en un segundo tiempo, en función del estadio y las características del tumor.

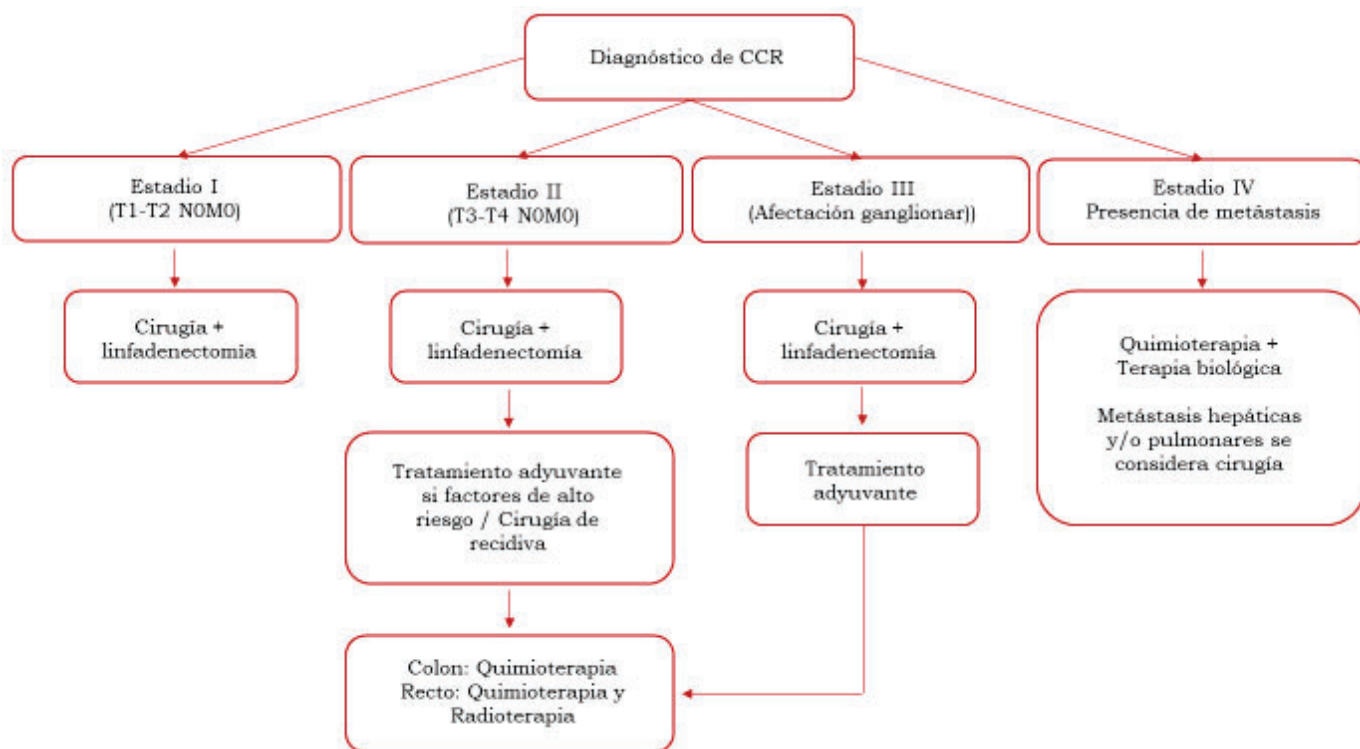


Figura 3: Esquema del manejo terapéutico del CCR. Autoría: Sherley Diaz Mercedes.

2. Programas de Cribado Poblacional de cáncer colorrectal

El CCR suele desarrollarse lentamente durante un largo periodo de tiempo y es curable si se detecta en etapas muy tempranas. La enfermedad se puede prevenir y se conocen las lesiones premalignas, por lo que es posible identificarlas y extirparlas antes de su progresión. En general, el diagnóstico de CCR se realiza por dos métodos, en pacientes que presentan algún síntoma gastrointestinal (cambio en el hábito deposicional, dolor, fatiga, pérdida de peso, etc), o mediante los programas de cribado poblacional. Por tanto, el cribado y la detección precoz son medidas excelentes para la prevención secundaria del CCR, y para conseguir la disminución de la mortalidad asociada al mismo.

En España, el programa de cribado del CCR se implementó en el año 2014 (Orden SSI/2065/2014) y está dirigido a personas con riesgo medio de CCR,

que corresponden a población general de entre 50 y 69 años sin factores de riesgo o antecedentes familiares relevantes de CCR. Actualmente el programa ya está implantado en todo el territorio nacional español. En la población con criterios de alto riesgo de CCR, como padecer de una enfermedad inflamatoria intestinal crónica (colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), o pacientes con cáncer familiar o hereditario, se realiza una valoración individual con seguimiento a través de protocolos de actuación específicos. Desde que se implantaron los programas de cribado de CCR en España, se ha demostrado la eficacia de los mismos en la reducción de la morbilidad y la mortalidad por CCR (19).

En España se realiza el cribado utilizando las pruebas no invasivas de sangre oculta en heces (SOH), basadas en pruebas inmunoquímicas fecales para hemoglobina, con detección de globina humana (FIT). El FIT detecta cantidades microscópicas de sangre. No obstante, en algunos países se utiliza como primera opción la sigmoidoscopia (20).

El proceso de cribado se realiza con invitaciones a realizar la prueba de detección de SOH con FIT cada dos años, utilizando calendarios para poblaciones y centros de atención primaria. Las invitaciones se envían a la población siguiendo un orden de centros de atención primaria para evitar la saturación de los laboratorios y unidades de endoscopia y mantener la duración de dos años de cada ronda de cribado. Del proceso de invitación se encarga la oficina de cribado de cada territorio, y se realiza mediante una carta enviada al domicilio, para participar en el programa. En la carta se indica dónde recoger la prueba diagnóstica de SOH, bien en la farmacia o en el centro de atención primaria según el municipio donde se vive, junto con las instrucciones de cómo conservarla hasta su devolución (**Figura 4**).

Una vez realizada la prueba, el paciente recibe una carta con el resultado. Si el resultado es negativo, los participantes recibirán una carta informativa y

una invitación bianual para seguir participando en el programa de cribado. Si por el contrario el resultado del test de SOH es positivo, a los participantes se les ofrece la realización de una colonoscopia en el centro respectivo y se informará del resultado, con un seguimiento individualizado a partir de ese momento.

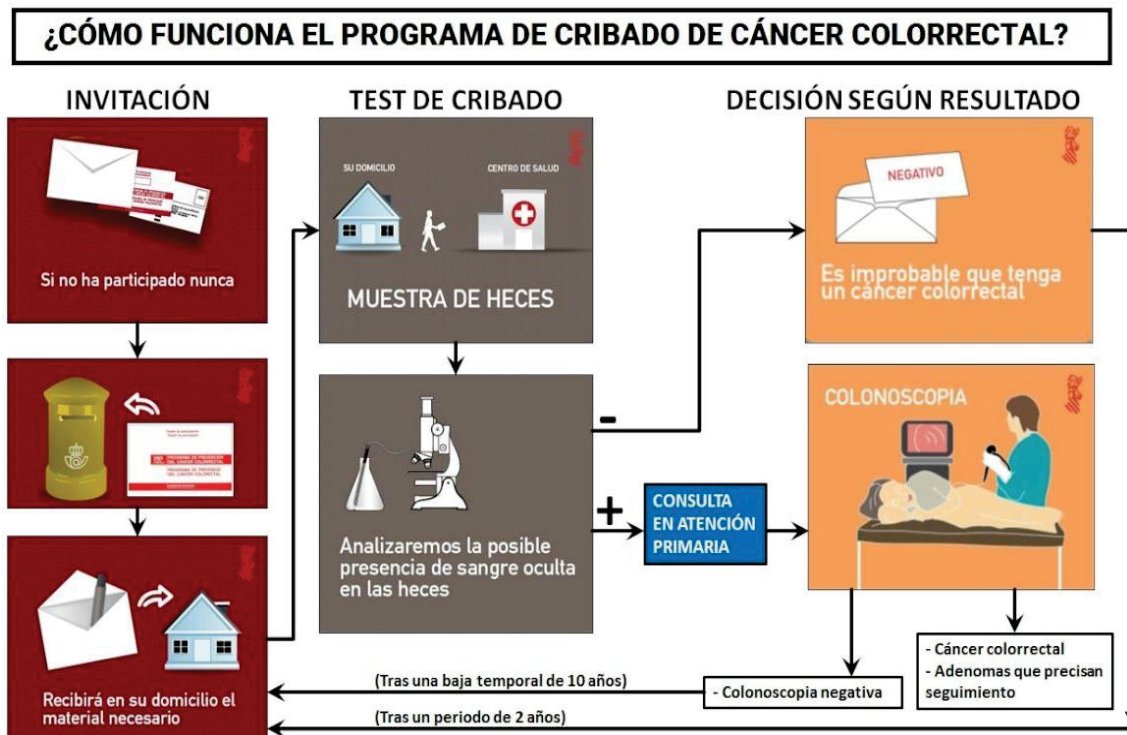


Figura 4: Esquema del programa de prevención y cribado del CCR (21)

Los programas de cribado de base poblacional permiten la detección de pólipos de bajo riesgo, alto riesgo y de CCR. Un 70% de los CCR diagnosticados en programas de cribado se encuentran en estadios precoces (estadios I-II). Se requiere una confirmación diagnóstica histológica de cualquier lesión reseca por endoscopia.

2.1. Colonoscopia y toma de muestras

La colonoscopia es el método estándar de oro (Gold Standard; GS) de detección de lesiones benignas, precursoras de malignidad, o CCR, tanto de pacientes

procedentes del cribado de CCR como no. Es un método muy efectivo y preciso que permite una adecuada visualización de la mucosa colorrectal. Además, es la prueba óptima para el seguimiento de los pacientes, siendo el método recomendado por la gran mayoría de sociedades internacionales de gastroenterología (22).

Simultáneamente, la técnica permite la toma de biopsias o la resección de lesiones, y por consiguiente permite un diagnóstico histológico de confirmación de la sospecha diagnóstica, así como la obtención de material para estudios moleculares.

Además, es la única técnica que permite realizar un proceso terapéutico al momento, mediante la extirpación endoscópica, polipectomía, mucosectomía o disección submucosa, entre otras. Sin embargo, las características endoscópicas de una lesión en la mucosa colorrectal no siempre predicen su grado de malignidad, por lo que es necesario el estudio histológico para su adecuado diagnóstico.

Dependiendo de los hallazgos endoscópicos, la actitud puede variar. Si la lesión puede ser resecada completamente por vía endoscópica, ya sea por presentar un tallo estrecho, no presentar un tamaño excesivo o estar en una localización accesible, se opta por la resección endoscópica utilizando la técnica más adecuada (polipectomía, mucosectomía, disección submucosa, resección en bloque, etc.).

En estos casos, se remite para estudio histopatológico la lesión completa, bien intacta o fragmentada, según la dificultad de la resección endoscópica. La evaluación histológica no se limita únicamente a la caracterización histopatológica de la lesión, sino que debe otorgar información pronóstica del potencial de recidiva local o de metástasis ganglionar de la misma (23).

2.2. Estudio histológico y estadificación patológica

Ante la presencia de un carcinoma infiltrante en una lesión reseca endoscópicamente, suele tratarse de un carcinoma que infiltra la submucosa (pT1). El análisis patológico debe incluir todos los factores de riesgo de metástasis ganglionar. El informe patológico debe incluir: el tamaño del carcinoma, el tamaño y tipo de adenoma sobre el que se origina, el grado histológico, la presencia y grado de *tumor Budding*, la presencia de *poorly differentiated clusters*-PDC, la invasión linfovascular y perineural, la profundidad de invasión en μm de la submucosa, la disrupción de la muscularis mucosae, el nivel de invasión de Haggitt en pólipos pediculados, el estado de los márgenes de resección laterales (mucosos) y profundo, así como la distancia del componente infiltrante a los mismos (**Tabla 1. Figura 5**).

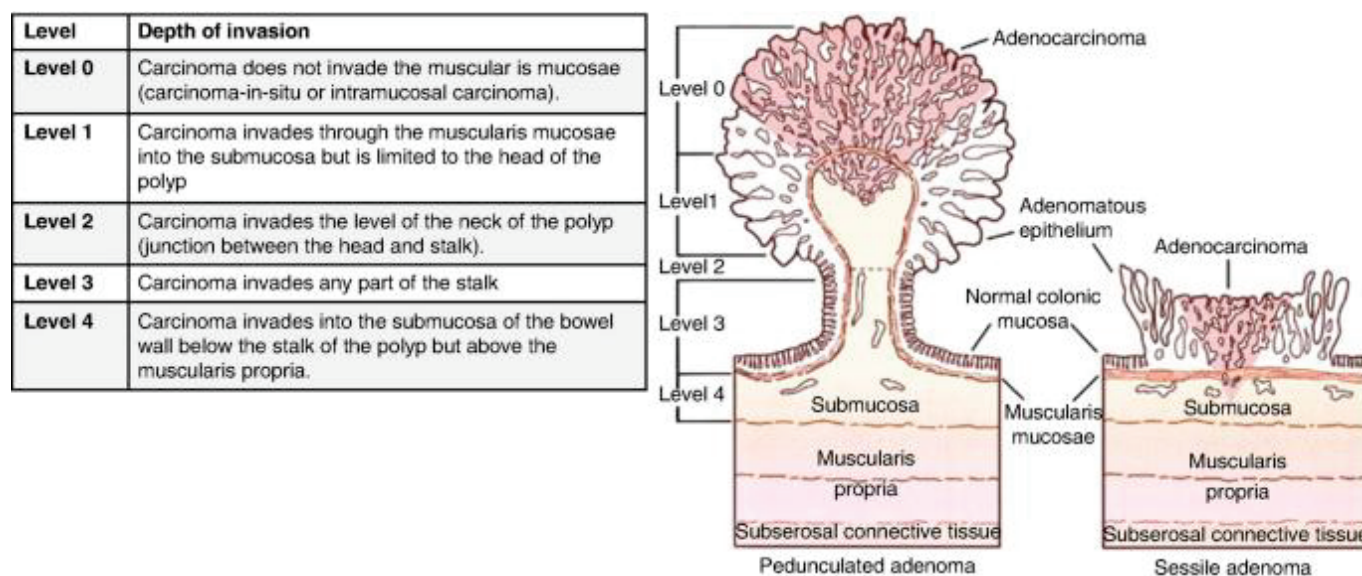


Tabla 1: Nivel de infiltración submucosa de Haggitt en pólipos pediculados.

Figura 5: Esquema Niveles de invasión histológica de Haggitt (24)

Con estos datos se podrá tomar la decisión terapéutica curativa entre un abordaje conservador con control endoscópico o el manejo intervencionista mediante resección local submucosa o que incluya la pared (sobre todo en

lesiones rectales) o resección quirúrgica del tramo colónico afecto. Si el estudio histológico revela la presencia de factores de alto riesgo de metástasis ganglionar en los pT1, se procederá al tratamiento quirúrgico de la lesión **(Tabla 2)**.

Ejemplo de probabilidad predictiva (%) de metástasis derivada de LASSO en CCR T1 pediculado basado en factores de riesgo histológico. Traducido al español.

		Muscularis mucosa tipo A		Muscularis mucosa tipo B	
		Budding -	Budding +	Budding -	Budding +
Haggitt 1-3	LVI -	0.3	0.6	2.1	3.7
	LVI +	1.2	2.2	7.4	12.3
Haggitt 4	LVI -	1.4	2.4	8.2	13.6
	LVI +	5.0	8.5	24.8	36.8

Leyenda; LASSO: operador de selección y mínima contracción absoluta, LVI: invasión linfovascular presente (+) o ausente (-). Ejemplo, un CCR T1 pedunculado con infiltración de la capa muscularis de la mucosa tipo A, Haggitt nivel 4 de invasión, sin afectación linfovascular y Budding -, presenta un riesgo de metástasis de 1.4%

Tabla 2: Riesgo de metástasis en los CCR desarrollados en adenomas. Fuente: Grupo de trabajo holandés sobre CCR T1 (25)

Debido a que existe una gran necesidad de obtener una mayor precisión en el diagnóstico y la estadificación del CCR, existen guías específicas para el control de pacientes de riesgo.

Las recomendaciones de la NICE se basan en revisiones sistemáticas de la evidencia disponible de la experiencia y opinión de grupos expertos y de directrices sobre las buenas prácticas clínicas (26). Varios indicadores pueden revelar el potencial maligno subyacente de una lesión durante la evaluación endoscópica (tamaño, morfología, ulceración, etc), hay autores que han remarcado la debilidad del potencial predictivo de algunas de estas variables.

Por tanto, no es inusual la realización de colonoscopias reiteradas para reevaluar el área de la resección de una lesión premaligna/maligna, con la consiguiente necesidad de localizar con precisión el lecho de resección. Entre las diferentes técnicas de localización, la inyección submucosa de colorantes tales como la tinta china han demostrado resultados comprobados (27).

En el caso de que las características endoscópicas impidan una exéresis completa o si se sospecha la existencia de un componente infiltrante profundo, se puede optar por la realización de una biopsia de la lesión y tatuaje distal de la misma para identificarla posteriormente en el acto quirúrgico.

El estadio del CCR en el momento del diagnóstico es el factor pronóstico más importante. **La estadificación patológica del CCR** se basa en la evaluación del **tumor primario**: profundidad de infiltración local de la pared colorrectal (estadio pT), el número de **ganglios linfáticos** (GLs) regionales afectados (estadio pN) y en la presencia o no de **metástasis a distancia** (estadio pM).

2.2.1. Estadio tumoral – pT

El estadio pT se clasifica según la profundidad de la invasión local de la pared colónica. En el CCR el tamaño del tumor no influye en el estadio tumoral pT.

Si no hay evidencia histológica de tumor se clasifica pT0, un tumor que se encuentre localizado en la mucosa con infiltración de la lámina propia y/o muscularis de la mucosae se clasifica como pTis, cuando la tumoración infiltra la capa submucosa se clasifica pT1, si la tumoración afecta la capa muscular propia se clasifica pT2, si alcanza el tejido adiposo pericolónico entonces se clasifica como pT3, si sobrepasa el tejido pericolónico e infiltra la capa serosa se clasifica pT4a, y si infiltra estructuras anatómicas adyacentes como pT4b **(Figura 6A-B)**.

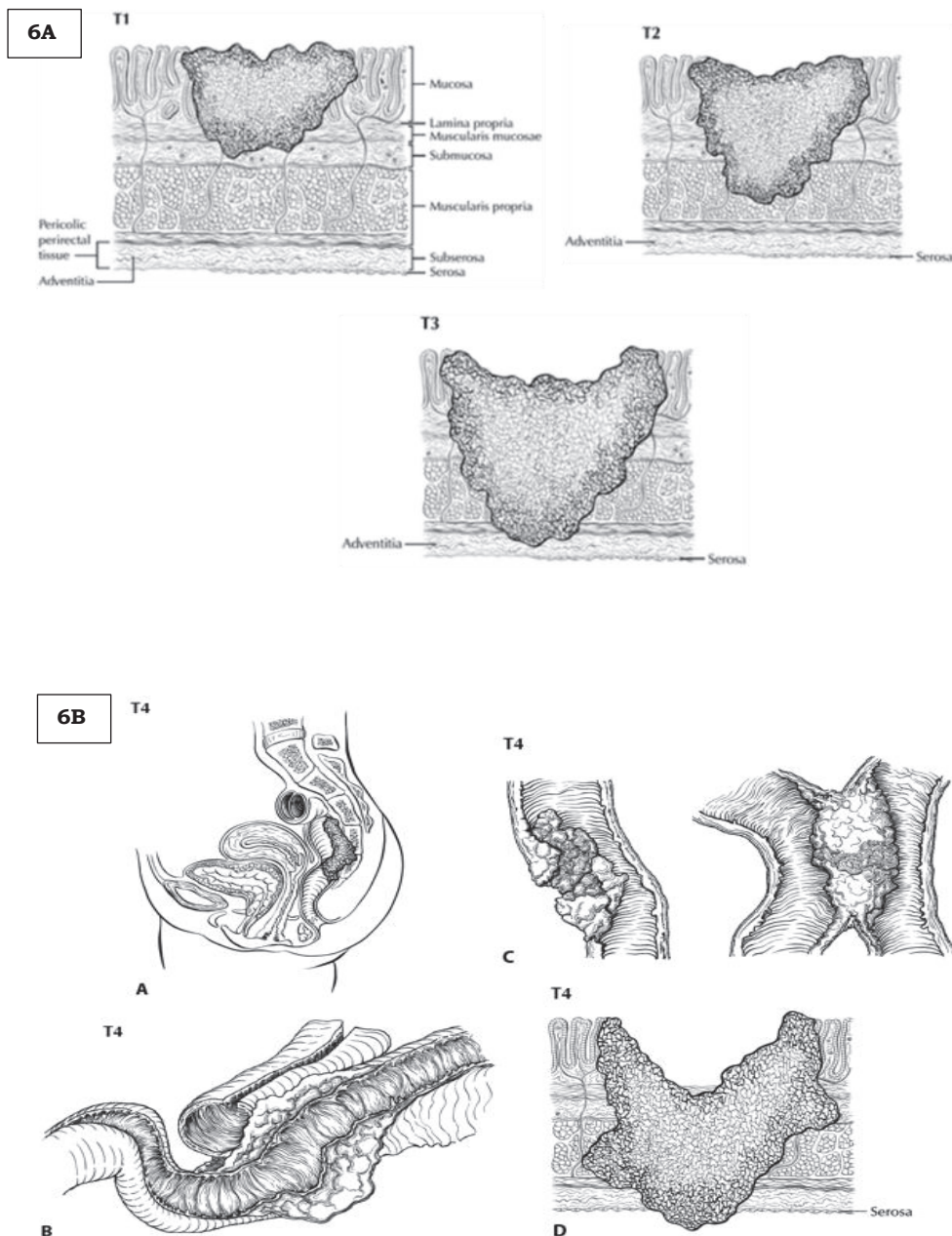


Figura 6A-B: Estadío pT según la invasión local de la pared colónica por el CCR (28)

2.2.2. Estadio ganglionar – pN

El estado de los GLs regionales es uno de los factores pronósticos más importantes en el CCR, además la presencia de metástasis en los GLs determina la necesidad de realizar tratamiento adyuvante a los pacientes. El pN se clasifica en: ausencia de afectación de GLs (pN0), metástasis a 1 GL

(pN1a), presencia de 2 o 3 GL positivos (pN1b), entre 4 y 6 GL positivos (pN2a), y 7 o más ganglios positivos (pN2b). En el caso de que no se detecte afectación en GLs, pero se observen depósitos neoplásicos en tejidos pericolónicos, el estadio es pN1c. Cuando se aíslan menos de 12 GLs y se ha examinado exhaustivamente la grasa, puede diagnosticarse como estadio pN0, pero con menos garantías de la veracidad de pN0, dada la baja sensibilidad del estudio histológico.

Las guías actuales de estadificación están basadas en el estudio histológico de los GLs mediante hematoxilina-eosina (HE). En el CCR la afectación ganglionar se evalúa mediante estudio histológico de los ganglios linfáticos (GLs) aislados de la grasa pericolónica o perirrectal de una pieza de resección quirúrgica.

El estadio patológico ganglionar pN se obtiene tras el análisis con el microscopio óptico del número de GLs con afectación neoplásica sobre el total de GLs disecados de la pieza quirúrgica. Para alcanzar un estadiaje más preciso la American Joint Committee in Cancer (AJCC) recomienda que un mínimo de 12 GLs sean examinados para que la negatividad de todos los ganglios linfáticos analizados sea fiable y poder considerar la resección quirúrgica curativa (estadios I-II; pT1-4 pN0). En estadios I-II, los pacientes no recibirían neoadyuvancia, a excepción de un subgrupo de alto riesgo dentro del estadio II (29).

Aunque en la mayoría de los casos de CCR en estadios avanzados de la enfermedad, la estadificación ganglionar mediante la evaluación histológica con HE es apropiada, hay pruebas sustanciales de que está lejos de ser exacta en estadios precoces (I-II).

Esto es debido a la baja sensibilidad del análisis histológico con HE, dado que cada GL se evalúa realizando una sección central de 2-5 micras de grosor,

dejando el resto del ganglio sin analizar. Así, la parte analizada del GL con HE es limitada y representa menos del 0,5% del volumen total del GL, lo que puede conducir a falsos negativos (30).

De hecho, hasta el 25% de los pacientes con una resección quirúrgica potencialmente curativa, con diagnóstico pN0 mediante HE, sufren una recidiva de la enfermedad. Por ello, se postula que algunos de estos pacientes pueden tener metástasis ganglionares o mínima enfermedad residual ganglionar no detectadas inicialmente por HE (31).

Dado que un 70% de los CCR diagnosticados en un contexto de cribado corresponden a estadios I-II, se ha realizado un gran esfuerzo en los últimos años para intentar realizar una estadificación ganglionar más precisa y por lo tanto un mejor diagnóstico de los pacientes, utilizando para ello técnicas más sensibles basadas principalmente en técnicas inmunohistoquímicas y moleculares.

2.2.3. Estadio metastático / Diseminación a distancia – pM

El estadio pM (metástasis) se define como la extensión de la neoplasia a órganos adyacentes y/o distantes y se subclasifica en: ausencia de metástasis pM0, metástasis en un órgano sin afectación peritoneal pM1a, metástasis en dos órganos sin afectación peritoneal pM1b y metástasis a nivel peritoneal, con o sin afectación de otros órganos pM1c (32).

Estos estadios patológicos o quirúrgicos son más precisos que los estadios clínicos. Se realizan en conjunto con la evaluación del estado de los pacientes con un examen físico completo, analítica completa y los estudios por imagen prequirúrgicos para poder establecer el correcto estatus del paciente, lo que ayuda para el adecuado manejo y tratamiento personalizado de los pacientes con CCR (**Tabla 3**).

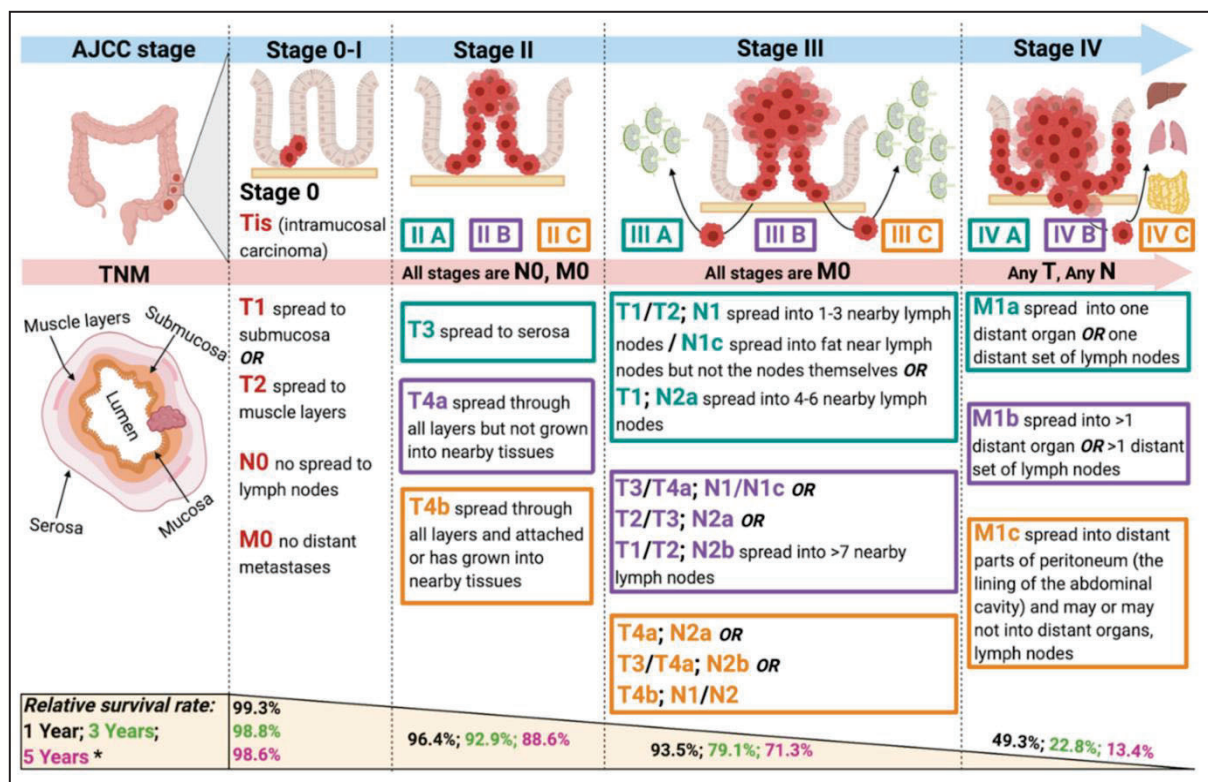


Tabla 3: Estadificación clínico-patológica y porcentaje de supervivencia del CCR según American Joint Committee on Cancer (AJCC), 8th Ed. (33)

3. Estudios de extensión y seguimiento

3.1. Estudios de extensión

Tras el diagnóstico de CCR con confirmación histológica, se realiza un estudio de extensión tumoral para determinar la presencia de diseminación local y/o a distancia de la enfermedad, el cual se realiza con pruebas de imagen.

Aproximadamente el 20% de los pacientes con diagnóstico de CCR tienen metástasis sincrónicas, siendo el órgano más frecuentemente afectado el hígado (17%), seguido por peritoneo (5%), pulmón (5%) y los ganglios linfáticos (3%).

3.1.1. Pruebas de imagen

3.1.1.1. Tomografía Axial Computarizada (TAC)

La realización de TAC de tórax, abdomen y pelvis, con administración de contraste intravenoso es el método radiológico de preferencia para determinar lesiones metastásicas en todos los pacientes con diagnóstico de CCR.

Esta prueba permite evaluar la extensión tumoral y sus complicaciones (obstrucción, perforación, fistula, absceso). Sin embargo, esta técnica pierde sensibilidad en la detección de metástasis peritoneales, donde es relativamente pobre y depende de la localización y tamaño del implante.

3.1.1.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es la modalidad de imagen más precisa para la evaluación de los pacientes con CCR. La resonancia magnética realizada con una intensidad de campo alta favorece una mayor adquisición de las imágenes, con mayor resolución espacial y mejor calidad (34).

La RMN con contraste permite una mejor definición de los tejidos blandos. Constituye la prueba de referencia cuando sea necesario evaluar la relación de los tumores localmente avanzados con las estructuras adyacentes o para la definición de lesiones hepáticas ambiguas previamente detectado por TAC. Asimismo, la RMN puede sustituir la TAC en pacientes con alergias al contraste yodado o con insuficiencia renal crónica.

3.1.1.3 Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

La Tomografía por Emisión de Positrones con fluorodesoxiglucosa (FDGPET), no añade información significativa al TAC en la estadificación preoperatoria

del CCR y no se recomienda para uso rutinario en la estadificación del CCR localizado, más allá de ayudar en la interpretación de hallazgos ambiguos (preferentemente cuando existe elevación de marcadores tumorales, sin evidencia de lesiones en las pruebas de imagen).

3.2 Seguimiento del CCR

El seguimiento y la vigilancia activa forman un aspecto importante de la atención en pacientes con CCR. El objetivo principal es detectar una recurrencia temprana y una intervención oportuna en estos pacientes. La mayoría de las recurrencias suelen ocurrir durante los 3 años posteriores a la cirugía y el 90% a los 5 años. El objetivo principal del seguimiento de estos pacientes es la detección temprana de lesiones metastáticas para poder facilitar un tratamiento quirúrgico con intención curativa de las recaídas (35,36).

En pacientes en los que se les ha realizado una polipectomía endoscópica con diagnóstico de CCR con infiltración submucosa (pT1), el riesgo de metástasis ganglionares es muy bajo y depende de la presencia de factores de riesgo adversos como son la invasión vascular, el alto grado histológico y el alto *tumor Budding*.

0En función de ello, los pacientes se someten a control endoscópico o se realiza cirugía. La presencia de margen de resección profundo positivo o a <1mm se relaciona con riesgo de recurrencia local y el seguimiento se realiza mediante colonoscopias de repetición para la valoración de la base de resección del pólipo, o bien con cirugía según la valoración individual del tumor. En los pT1 originados sobre pólipos pediculados con un carcinoma confinado a la cabeza, cuello o tallo (Haggitt 1-3) la resección endoscópica y posterior seguimiento endoscópico es suficiente, siempre que no se hayan identificado la presencia de otros factores de riesgo desfavorables.

En pólipos con cáncer en los que se haya resecado la lesión y existan factores de riesgo de afectación ganglionar, cuando no es posible la realización de cirugía con intención curativa debido a comorbilidades significativas, el seguimiento se basa en la realización de colonoscopia de vigilancia en los 6 meses posteriores y vigilancia oncológica estrecha con realización de técnica de imagen cada 6 meses durante 3 años (USE para el recto, TAC para el colon) y posteriormente seguimiento anual hasta los 5 años (basado en el protocolo asistencial del Hospital Clinic de Barcelona).

En los CCR estadio I (pT1-2 N0M0), excepto pT1N0M0, existe una baja probabilidad de recidiva, lo que permite efectuar un seguimiento postoperatorio menos estricto que en el resto de pacientes. La estrategia de seguimiento va dirigida a detectar la eventual progresión o la aparición de lesiones metacrónicas.

Los pacientes con CCR estadio II y III, resecados con finalidad curativa, se benefician de un seguimiento intencionado dirigido a detectar precozmente una eventual recidiva neoplásica o una neoplasia colorrectal metacrónica.

En general el seguimiento de estos pacientes se puede clasificar en tres grupos:

- Cáncer de colon de bajo riesgo: estadio II sin criterios de riesgo y pT1 de alto riesgo tratado quirúrgicamente.
- Cáncer de colon de alto riesgo: estadio II con criterios de riesgo o estadio III.
- Cáncer de recto: estadio II o estadio III.

En pacientes con cáncer de colon de bajo riesgo el programa de vigilancia postoperatoria recomendado incluye:

- a. Anamnesis, exploración física y control analítico con determinación de la concentración sérica de CEA a los 12 y 36 meses y luego considerara según evolución clínica del paciente.

- b. TC abdominal a los 12 y 36 meses, complementario con el CEA.
- c. Colonoscopia a los 12 y 36 meses y si negativas cada 5 años.

En pacientes con cáncer de colon de alto riesgo el programa de vigilancia postoperatorio recomendado incluye:

- a. Anamnesis, exploración física y control analítico con determinación de la concentración sérica de CEA cada 3 meses durante los 2 primeros años, y cada 6 meses durante los 3 años siguientes.
- b. TC toracoabdominal cada 12 meses durante los 2 primeros años (a combinar con el TC abdominal cuando coincida), luego bianual hasta los 5 años.
- c. Colonoscopia a los 12 y 36 meses y si negativas cada 5 años.

En pacientes con cáncer de recto el programa de vigilancia postoperatoria recomendado incluye:

- a. Anamnesis, exploración física y control analítico con determinación de la concentración sérica de CEA cada 3 meses durante los 2 primeros años, y cada 6 meses durante los 3 años siguientes.
- b. TC toracoabdominal cada 6 meses durante los 2 primeros años, y cada 12 meses durante los 3 años siguientes.
- c. Colonoscopia a los 12 y 36 meses y si negativas cada 5 años.

En pacientes con CCR estadio IV, la estrategia de seguimiento dependerá fundamentalmente del tratamiento realizado.

- a. Pacientes con metástasis hepáticas y/o pulmonares tratados mediante resección quirúrgica con finalidad radical serán tributarios de un programa de vigilancia intensiva dada su elevada probabilidad de recaída, aunque no existen estudios que demuestren inequívocamente que esta práctica condicione un mejor pronóstico. El programa de vigilancia incluye controles clínicos y analíticos, con determinación de la concentración sérica de CEA, cada 3 meses durante los 2 primeros

años y cada 6 meses durante los 3 años siguientes, TAC abdominal cada 3 meses durante los 2 primeros años y cada 6 meses durante los 3 años siguientes, TAC torácico y abdominal cada 6 meses durante los 2 primeros años y anual durante los 3 años siguientes y colonoscopia al 1º y 4º año.

- b. Pacientes con metástasis hepáticas tratados con ablación por radiofrecuencia, la evaluación de la respuesta se efectuará mediante TAC abdominal al cabo de 1 mes y, en caso necesario, con ecografía con contraste. El programa de seguimiento incluirá controles clínicos, analíticos (con determinación de la concentración sérica de CEA) y radiológicos (TC abdominal) a los 3 meses del tratamiento exitoso, y cada 6 meses posteriormente.
- c. Los pacientes con metástasis hepáticas irresecables sometidos a tratamiento quimioterápico serán seguidos mediante controles clínicos y analíticos cada 3 meses. La evaluación de la respuesta se efectuará a los 3 y 6 meses mediante TC abdominal. En los pacientes con progresión tumoral o únicamente subsidiarios de tratamiento sintomático, el seguimiento se individualizará en función de la sintomatología y complicaciones que presente.

Siempre que se sospeche la existencia de recidiva tumoral hepática o en otra localización, ya sea por la elevación del CEA, pruebas de imagen de control, o la presencia de sintomatología sugestiva, se efectuarán las exploraciones complementarias pertinentes a fin de descartar o confirmar esta eventualidad (37).

3.2.1 Biomarcadores en el seguimiento del CCR

La expresión de biomarcadores con un patrón constante o “firmas” de un gen o proteína permite dividir en subgrupos los tumores o carcinomas. Así, los biomarcadores reflejan las características biológicas comunes de cada grupo de tumores. Se pueden dividir en categorías: 1- diagnósticos, 2- pronósticos y

3- predictivos. Se pueden utilizar como herramienta para la detección temprana del CCR, así como para la selección de un tratamiento individualizado de los pacientes. Por lo tanto, los biomarcadores brindan utilidad en diferentes etapas de la enfermedad para determinar la progresión además de proporcionar un indicador personalizado de efectividad terapéutica.

3.2.1.1 Antígeno carcinoembrionario (CEA)

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de membrana que pertenece a una gran familia de 29 genes de los cuales sólo 18 se expresan. La monitorización de sus niveles en sangre ha demostrado ser de utilidad para predecir la recidiva del CCR. Aunque en general suele tener baja sensibilidad y puede dar falsos negativos sobre todo en pacientes con tumores indiferenciados.

Por ello, las guías actuales de la NCCN recomiendan la determinación de niveles de CEA cada 3-6 meses en los primeros 3 años tras la resección de un CCR estadio II o III, y después continuar cada 6 meses hasta cumplir los 5 años de seguimiento. Las recomendaciones de la Sociedad Europea de Oncología Médica son similares (38).

3.2.1.2 Biopsia líquida y miARN

En los últimos años se han ido desarrollando técnicas con el fin de evaluar y caracterizar el componente neoplásico que se presenta en la sangre periférica de pacientes oncológicos. Este componente neoplásico se puede presentar en forma de células tumorales circulantes (CTC), cluster celulares, ADN circulante de tumor (ctDNA), microRNAs (mRNAs), ARN largo no codificante (lncRNAs) y proteínas circulantes en diversas formas. La evaluación de estos componentes en la sangre periférica se realiza dentro de condiciones clínicas

determinadas, pudiendo mejorar la detección y el diagnóstico del CCR y predecir la recaída y la metástasis de forma precoz, antes de que sean visibles por métodos de imagen. También son eficaces para monitorizar la enfermedad mínima residual (MRD) y la resistencia a los medicamentos en pacientes con CCR que reciben quimioterapia (39).

El desarrollo de estas técnicas diferentes se enfoca en el estudio de un sustrato concreto y presentan distintas características. El análisis de CTC permite la cuantificación nominal del número de células circulantes, lo cual puede correlacionarse con el pronóstico y la respuesta al tratamiento. Además, su detección permite su posterior caracterización tanto proteica como genómica, pudiendo realizarse cultivos celulares, estudios de expresión proteica o análisis mutacionales, lo cual puede aportar datos de pronóstico o de resistencia terapéutica.

Por otro lado, mediante la evaluación de ADN circulante tumoral (ctDNA) se ha mostrado que en pacientes con CCR se pueden evaluar múltiples alteraciones moleculares. Los miARN específicos se pueden utilizar para monitorizar la resistencia o la tolerancia a la quimioterapia y para la selección del enfoque terapéutico de los pacientes (40,41).

Terapias dirigidas contra estos miARN podrían mejorar la quimiosensibilidad al oxaliplatino y al 5-FU, lo que representa un enfoque prometedor para el tratamiento del CCR.

Muchas de estas evaluaciones se están realizando en el contexto del tratamiento de pacientes metastásicos potencialmente tratables, mediante la evaluación no solo del estatus mutacional y en potenciales dianas terapéuticas. Esto puede ser especialmente útil para la selección de alternativas terapéuticas adicionales enfocadas a alteraciones específicas.

4. Técnicas moleculares para la estadificación ganglionar del CCR

Hay evidencias que indican que la presencia de micrometástasis en los GLs se asocia a un mayor riesgo de recidiva de la enfermedad y a peor supervivencia (42–44). El uso de métodos moleculares para la detección de micrometástasis en los GLs de CCR ha sido, hasta la actualidad, demasiado complejo para poderlos incorporar en la práctica clínica diaria de un laboratorio de Anatomía Patológica, con requerimientos excesivos de recursos técnicos, económicos y de personal.

Sin embargo, el ensayo *One Step Nucleic Acid Amplification* (OSNA) es de fácil implementación en los servicios de Anatomía Patológica y permite el análisis completo de los GLs en 11 minutos, siendo una técnica muy sensible para detectar la presencia de carga tumoral en los GLs. Por ello, el análisis de los GLs mediante OSNA en el CCR en estadios iniciales puede representar no solo un beneficio clínico para estos pacientes, permitiendo realizar una estadificación más precisa y adecuar el tratamiento, sino también un beneficio económico para el Sistema Nacional de Salud Español (45).

4.1. Técnica OSNA: Estudio molecular ganglionar y cuantificación del número de copias de ARNm de CK19/ μ L

La técnica molecular OSNA (Sysmex Corporation, Kobe, Japón) utiliza el método RT-LAMP (*Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification*), basado en RT-LOOP por amplificación isotérmica a 65°, para amplificar ARN mensajero (ARNm) de citoqueratina 19 (CK19), a partir de lisados de cualquier tejido, incluyendo GLs (**Figura 7**).

Este análisis es un método simple, automatizado, estandarizado, rápido y sensible, que proporciona resultados cuantitativos de la presencia de ARNm de CK19 (marcador de células epiteliales que no se encuentran en el ganglio

linfático en condiciones normales), con el sistema RD-210 (*Sysmex, Kobe, Japon*).

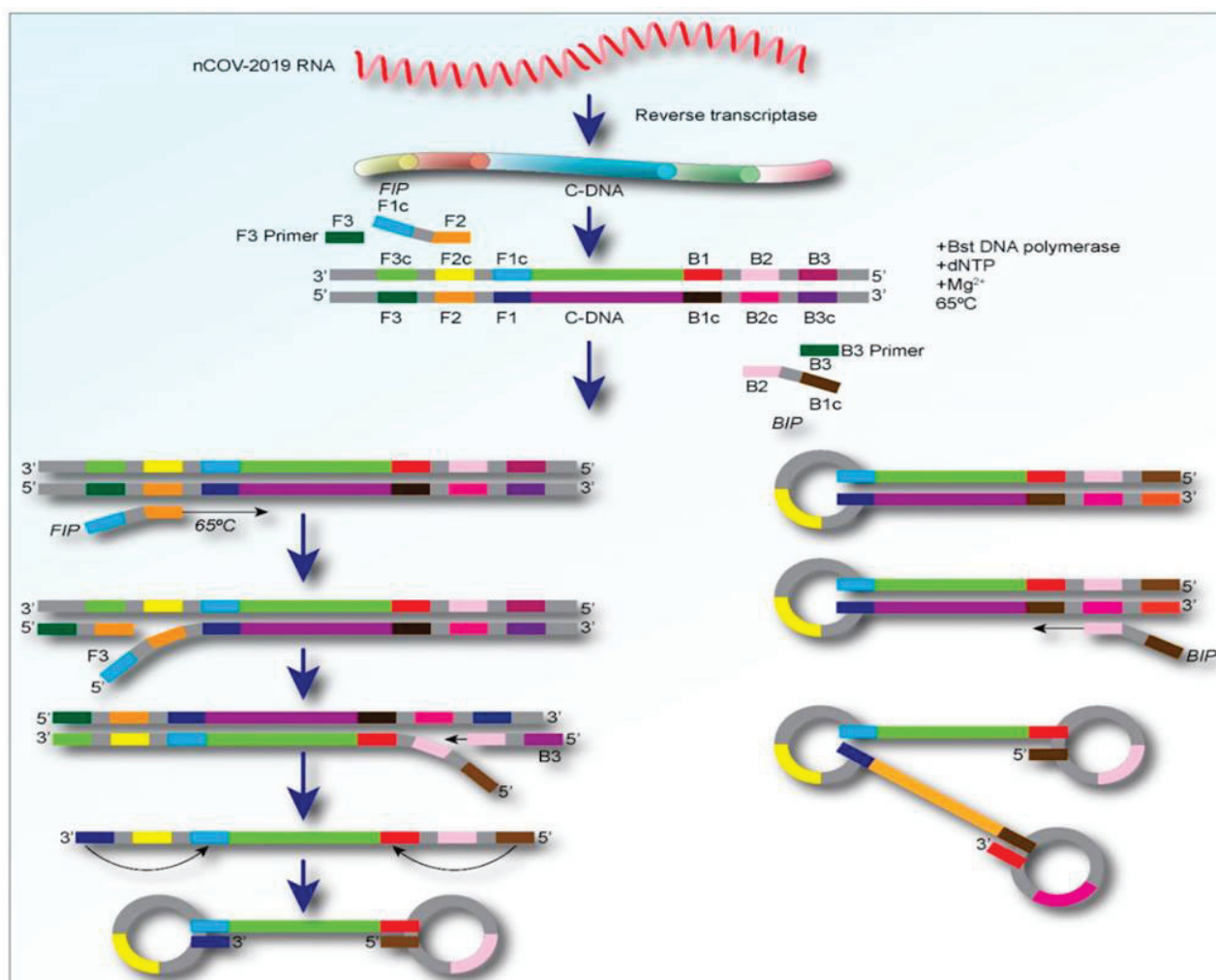


Figura 7: Amplificación RT-LAMP OSNA (46)

En comparación con otros métodos moleculares como RT-PCR, no es necesario la extracción o purificación del ARNm. Para el análisis, se colocan los GLs de cada tubo de PCR en un tubo Falcon y se añaden 4 ml del buffer de homogeneización Lynorhag, pH 3.5, que estabiliza las moléculas de RNAm y protege contra la actividad de la ribonucleasa, minimizando el efecto de sustancias inhibitoras y precipita el DNA genómico. Tras ello, los GLs se homogeneizan con un equipo RP-10 (*Sysmex, Kobe, Japon*) durante 2

minutos. Un mL de la muestra homogeneizada se introduce en un tubo de PCR y se centrifuga a 12.000 g, a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se pipetea 500 µl de la fase intermedia y se transfieren a un tubo de PCR para almacenar (muestra de *backup*) y otros 500 µl de la fase intermedia a otro tubo de PCR (muestra principal), de la cual se pipetea 20 µl a un tubo de PCR que contendrá 180 µl de Lynorhag (muestra de análisis). La muestra de análisis se introduce en el RD-210 donde se realizará la amplificación isotérmica a 65°C con Lynoamp, para detectar la presencia de CK19 RNAm en un tiempo aproximado de 11 minutos. Se podrán analizar hasta 14 muestras simultáneamente. La muestra de *backup* se congelará a -80°C y servirá para reanalizar la muestra en caso necesario (**Figura 8**).

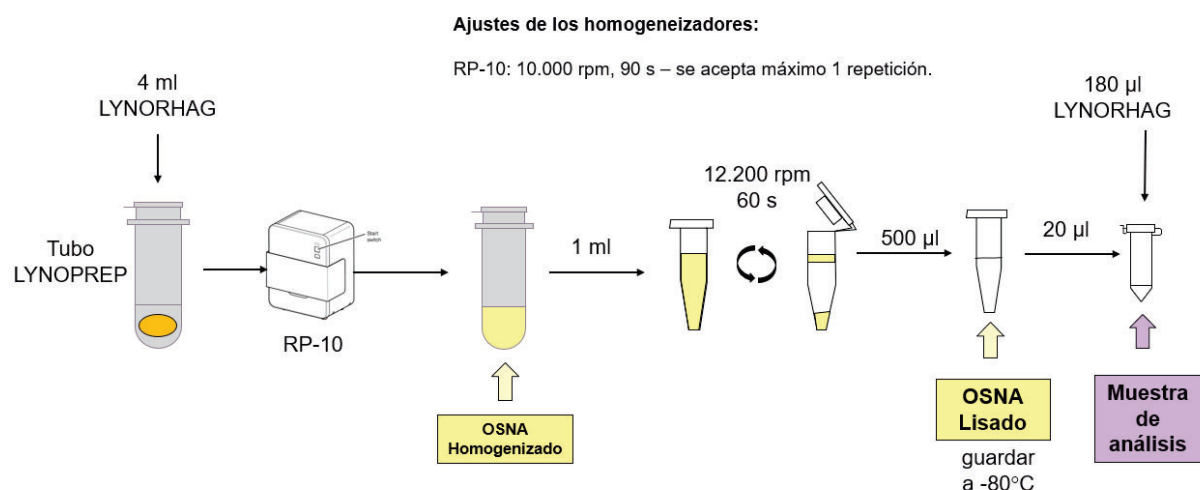


Figura 8: Método OSNA para el procesamiento de los ganglios linfáticos para análisis en RD210. Imagen cedida por Sandra López Prades.

La detección se lleva a cabo mediante la medición en tiempo real de la turbidez de la reacción. El pirofosfato, que se produce en el curso de la reacción de RT-LAMP, se une a magnesio para dar lugar a pirofosfato de magnesio. La cantidad de pirofosfato de magnesio aumenta con el paso de la reacción. Debido a que el pirofosfato de magnesio tiene una baja solubilidad en la solución acuosa y precipita cuando su concentración alcanza la saturación,

lo que causa la turbidez que es evaluada por la plataforma RD-210 en intervalos de 6 segundos.

El método OSNA es muy sensible. El resultado de la cantidad de ARNm de CK19 se correlaciona con el tamaño de la metástasis y la cantidad de células tumorales que contiene el GL (47,48). El sistema ha sido validado para el análisis de GLs centinela en cáncer mama y en GLs de CCR, con resultados comparables a un análisis histológico e inmunohistoquímico exhaustivo (49,50).

El método OSNA permite el análisis completo de los GLs. El resultado se expresa como la carga tumoral total (CTT), definida como la suma de todas las copias de ARNm de CK 19 presentes en todos los GLs aislados de la pieza quirúrgica de un determinado paciente.

Actualmente esta metodología ya está implementada de forma rutinaria en el estudio de los ganglios linfáticos centinela en pacientes con cáncer de mama, observándose que la CTT de los ganglios linfáticos centinela es capaz de determinar la probabilidad de metástasis en GLs axilares adicionales, con un punto de corte estimado de 15.000 copias de ARNm de CK19/ μ L por caso (51,52). Esto permite clasificar a estas pacientes en grupos de bajo y alto riesgo, independientemente del estadio patológico u de otros factores pronósticos (53).

También se utiliza OSNA para el estadio molecular de pacientes con CCR, y se está implementando para el análisis de GL en carcinomas de muchos otros órganos, como pulmón, tiroides, cérvix, próstata o endometrio (54-58). En CCR la CTT se correlaciona con la mayoría de los factores pronósticos en CCR (edad, sexo masculino, alto grado histológico, estadio T, estadio N, tumor *budding*, *poorly differentiated clusters*, invasión vascular linfática y perineural). Además, la CTT se ha establecido como un factor pronóstico en

CCR, inclusive en estadios tempranos de la enfermedad, demostrado por varios autores y por nuestro grupo (59-61).

4.2. Estadificación ganglionar del CCR mediante OSNA

En el CCR, la metodología empleada para el estudio de los GLs por OSNA se basa en la disección en fresco de todos los ganglios linfáticos de la pieza resección rectal o de colectomía. Una vez disecados los GL, se congelan a -80°C hasta el análisis en diferido de los mismos por OSNA.

El rango de peso del analizador OSNA se encuentra entre 40 y 600 mg. Utilizamos el método *pooling*, que consiste en analizar varios GL regionales en el mismo tubo de PCR, dado que los ganglios linfáticos pericolónicos y perirrectales corresponden a los ganglios regionales que drenan el tumor, a lo que hay que añadir que en colon y recto los GLs son de pequeño tamaño. Así, reducimos costes y tiempo de análisis, dado que, si se hubieran analizado todos los ganglios linfáticos de forma individual, algunos ganglios no alcanzarían el peso mínimo necesario y no se podrían evaluar molecularmente, además del elevado coste de analizar gran número de ganglios, que es un requisito necesario en el CCR.

Al realizar el análisis por método *pooling*, todos los GLs regionales disecados en el tejido adiposo de la pieza quirúrgica de colectomía o resección rectal se van introduciendo en cada tubo de PCR hasta que se alcanzaba el peso máximo de 600 mg. Los GLs de más de 600 mg se seccionan y procesan en tubos separados, sumándose el resultado de todos los tubos analizados. Así, con el método *pooling* se ahorra tiempo y dinero, dado que todos los ganglios de un CCR se analizan conjuntamente en uno o varios tubos, con lo que se realizan una media de 2,3 determinaciones moleculares por paciente, como se demostró Rakislova et al (62). Con este método, el análisis de los GLs de CCR resulta coste-efectivo, como hemos demostrado en nuestro segundo estudio,

aunque la técnica molecular sea más costosa que el análisis ganglionar con HE (**Figura 9**).

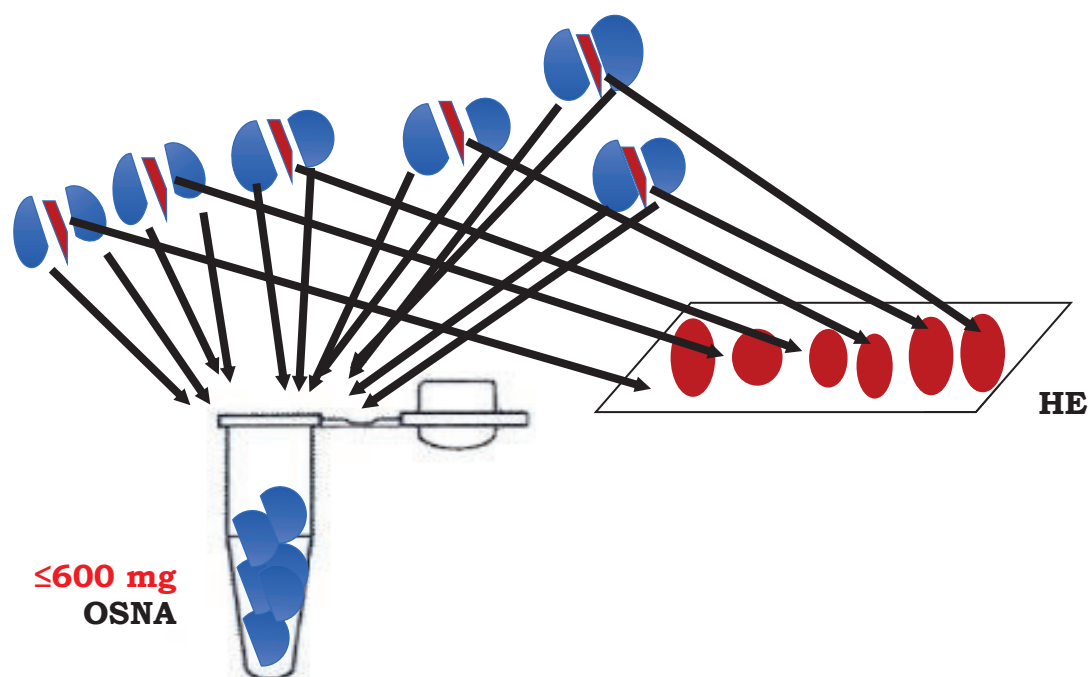


Figura 9: Método *Pooling* para el análisis de varios ganglios linfáticos mediante OSNA en CCR. Imagen cedida por Miriam Cuatrecasas Freixas

La presencia de metástasis en GLs en pacientes con CCR es un factor pronóstico importante, relacionado con la supervivencia, además de ser uno de los mayores determinantes de la necesidad de realizar tratamiento adyuvante. Se ha demostrado que la presencia de micrometástasis en los GLs de CCR tiene valor pronóstico y se asocia a mayor riesgo de recidiva de la enfermedad y a peores supervivencias, global y libre de enfermedad (63).

Se debe añadir que las guías actuales de estadificación ganglionar en CCR se basan en el número de GL positivos evaluados mediante HE, que es una técnica de baja sensibilidad, sobre todo en estadios precoces de CCR, donde pueden haber micrometástasis de difícil detección por HE, al analizar únicamente un corte central del GL, lo que puede conllevar a un sesgo de

localización de las micrometástasis. Por este motivo las guías diagnósticas determinan la necesidad de analizar un mínimo de 12 GL para poder asegurar un verdadero pN0 por HE.

La implementación de los programas de cribado de CCR ha resultado en un incremento en la detección de CCR en estadios I-II (pT1-4 pN0), por lo que se impone la incorporación de técnicas diagnósticas más sensibles y eficientes que la HE para un adecuado diagnóstico del estadio patológico ganglionar (pN) en estos pacientes.

4.3. Análisis de los ganglios linfáticos mediante extensiones citológicas como método morfológico alternativo a la HE para establecer el estadio patológico ganglionar (pN) del CCR

La citología se basa en la evaluación morfológica de células aisladas o en grupos, obtenidas de tejidos, mucosas o líquidos corporales. Es un método simple, menos invasivo que la toma de biopsias o la resección quirúrgica para el diagnóstico de distintos tipos de patologías.

Fue introducida en 1928 por George N Papanicolaou como una herramienta diagnóstica de patología neoplásica, lesiones precursoras o enfermedades benignas. Ha sido ampliamente utilizada en programas de cribado de cáncer de cérvix uterino y anal, lo que ha conseguido una gran reducción de su incidencia en muchos países.

Se usa de forma rutinaria en la práctica clínica para el diagnóstico, toma de decisiones y tratamiento de enfermedades, ya sea sola o como complemento al diagnóstico histológico. Además, es más económica y tiene un tiempo de respuesta menor.

4.3.1. Disección y procesamiento de los ganglios linfáticos

Se prepara la zona de trabajo, utilizando una superficie metálica limpia que se coloca sobre hielo triturado para mantener la zona de trabajo a baja temperatura. Sobre la superficie metálica se coloca papel de filtro limpio (no hace falta que sea estéril), y se coloca la pieza quirúrgica sobre el papel de filtro. Se utilizarán pinzas y hoja de bisturí estériles. Las piezas de resección quirúrgicas de colon o recto deben recibirse en el Servicio de Anatomía Patológica, antes de los 45 minutos de la extracción. Se verifica que se encuentra cerrada y que no existen fisuras en la pared, Se procede a separar el mesocolon o mesorrecto de la pared del colon o recto, respectivamente. Se lava la grasa con agua corriente vigilando no tocar ninguna superficie y se procede a disecar los GLs de la misma.

Todos los GLs disecados en fresco se cortan por la mitad para realizar una extensión citológica haciendo un movimiento circular sobre un portaobjetos pretratado limpio, con el fin de obtener una extensión en monocapa de células. Cada portaobjetos tendrá la representación de celularidad ganglionar correspondientes a 6 GLs, dividiendo la superficie total del portaobjetos en 6 zonas, y de esta manera poder identificar la cantidad de ganglios linfáticos aislados. Siguiendo el mismo protocolo, se puede hacer extensión de las dos mitades del ganglio linfático y obtener 2 extensiones por ganglio (3 ganglios por portaobjetos).

Las extensiones citológicas serán secadas al aire y guardadas en un congelador a -20°C o -80°C hasta la realización de la tinción inmunocitoquímica (ICQ) con CK19. Tras la realización de las extensiones citológicas, esa mitad del GL se fijará en formol para la evaluación morfológica mediante HE y la otra mitad se introducirá en el tubo de PCR para el análisis por OSNA. Se introducirán varios GLs en cada tubo de PCR, hasta un peso máximo de 600 mg, siguiendo el método *pooling* de análisis de varios GLs

simultáneamente. Después de la disección ganglionar, los tubos de PCR que contienen múltiples fragmentos de GLs deben almacenarse inmediatamente a -80°C hasta el análisis con OSNA.

La tinción ICQ con CK19 se puede realizar en los días siguientes. Se sumergen los portaobjetos pretratados en alcohol frío durante 10 minutos y se procederá directamente a la realización de la ICQ con CK19, sin recuperación antigénica utilizando el anticuerpo A53-B/A2, 760-4,281, Roche (**Figura 10**).

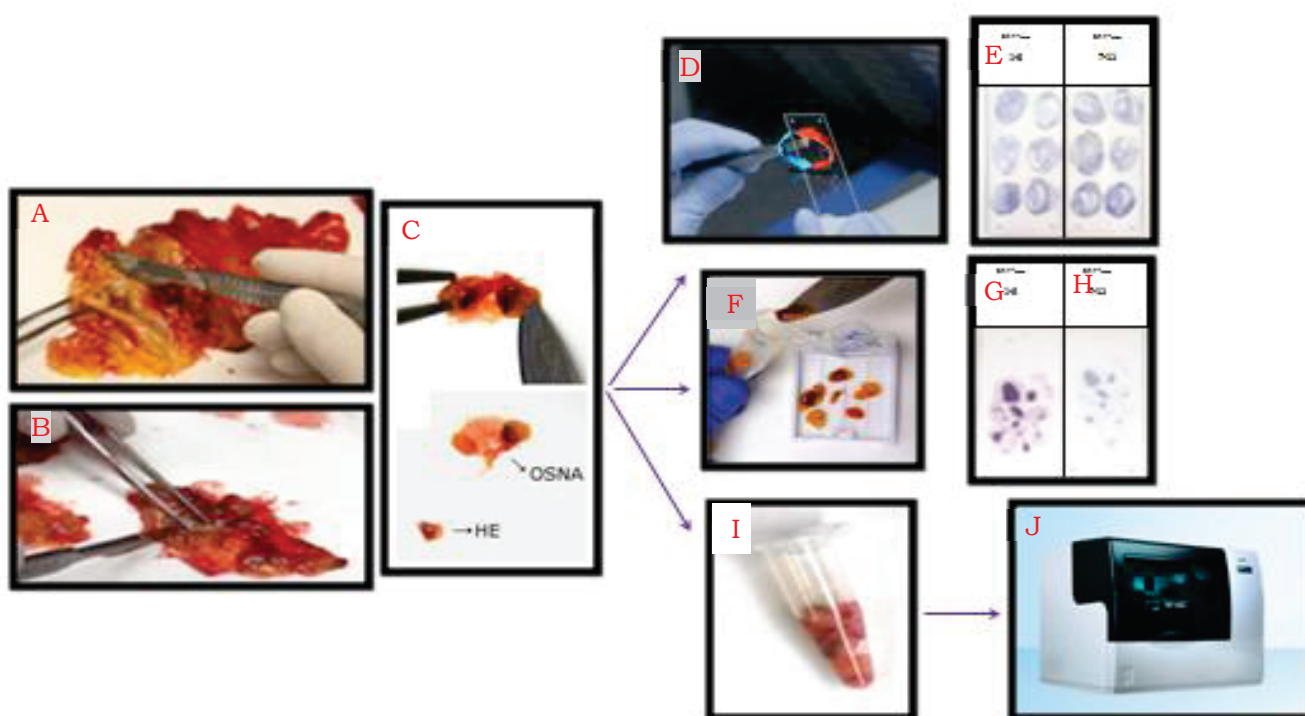


Figura 10: Procesamiento en fresco de los GLs linfático para estudio con improntas citológicas, HE y OSNA. A-B: Disección de los ganglios linfáticos en el tejido adiposo pericolónico o perirrectal. C: Realización de corte central de los GLs aislados. D: Se toma una mitad del GL y se realiza una impronta citológica haciendo un movimiento circular en el portaobjetos. E: El portaobjetos se inmunotiñe con CK19. F: Esa misma mitad del GL se coloca en un cassette para proceso histológico normal, y se G: tiñe con HE, H: e IHQ con CK19. I: La otra mitad del GL se coloca en un tubo de PCR y J: se realiza el estudio molecular con OSNA. Autoría: Miriam Cuatrecasas Freixas y Sherley Diaz Mercedes.

Asimismo, se realizará tinción inmunohistoquímica con CK19 de todos los CCR primarios para asegurar su positividad, lo que valida los resultados negativos para OSNA.

Una vez realizada la disección en fresco de los GLs, se fija la grasa y el resto de la pieza quirúrgica en formaldehído durante 24 horas. Tras ello, se procede a una segunda revisión de la grasa para identificar los GLs "residuales" que no se hayan encontrado en fresco, los cuales solo podrán ser analizados por el método histológico convencional (un corte central, teñido con HE).

El estadio patológico ganglionar (pN) se realizará con las preparaciones de las extensiones citológicas teñidas con ICQ con CK19, de esta manera podremos informar del valor pN con el análisis citológico como futura alternativa a la HE. Además, tendremos la pN resultante del estudio de la mitad del GL por HE y el análisis molecular de la otra mitad del GL mediante el método OSNA, por lo que obtendremos el resultado cuantitativo, la CTT (64).

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral se basa en evaluar el potencial de la utilización de las extensiones citológicas inmunoteñidas con CK19 para obtener el estadiaje ganglionar de forma morfológica, pudiendo dar el número de ganglios positivos (pN), con el fin de que pudiera reemplazar el estudio estándar de los GLs con HE, demostrando la no inferioridad de este método. Además, se analizan simultáneamente una mitad del GL con el método OSNA y la otra mitad con HE.

Con todo lo planteado anteriormente, se pretende poder utilizar en un futuro próximo todo el ganglio linfático para estudio molecular con OSNA y así poder obtener el valor real de la carga tumoral total de un determinado paciente, con el fin de obtener un estadio ganglionar más preciso en pacientes con CCR en estadios precoces, a la vez de poder informar del estadio pN con las

extensiones citológicas. Con ello se conseguiría mejorar el manejo terapéutico de pacientes con CCR en estadios iniciales.

HIPOTESIS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis del estudio número 1

El 70% de los CCR diagnosticados en los programas de cribado de CCR están en estadios iniciales I y II (pT1-4 N0). El estadio patológico ganglionar (pN) del CCR se obtiene mediante HE, que es poco sensible en estos estadios.

Dado que los métodos moleculares son más caros que el diagnóstico histológico convencional, nos propusimos analizar cuál sería el impacto económico para el Sistema Nacional de Salud español, si se implementara el análisis de los ganglios linfáticos de CCR en estadio II (pT3-4 pN0) con OSNA en los servicios de Anatomía Patológica.

Hipótesis del estudio número 2

La implementación del cribado poblacional de CCR ha resultado en el un incremento de detección de CCR en estadios precoces de la enfermedad, donde el estadio ganglionar pN con HE es poco sensible. En este escenario, nos planteamos poder analizar los ganglios linfáticos con un método más sensible, como la técnica molecular OSNA, y a su vez mantener el diagnóstico morfológico pN utilizando extensiones citológicas de los GLs, con el fin último de que pudieran sustituir la HE convencional. Para ello, comparamos el estadio pN convencional obtenido con HE, con el pN obtenido con extensiones citológicas de los GLs, y con el resultado de la carga tumoral total ganglionar obtenida por OSNA.

OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivos generales:

- Evaluar el impacto económico en el Sistema Nacional de Salud (SNS) español de la implementación del análisis de los ganglios linfáticos mediante OSNA en pacientes con CCR en estadio II (pT3-4 pN0).
- Obtener el estadio pN a partir de extensiones citológicas de los ganglios linfáticos de piezas de resección quirúrgica de cáncer colorrectal.

Objetivos secundarios:

- Analizar el coste del tratamiento y seguimiento de los pacientes con diagnóstico de CCR en estadio II durante un periodo de 3 años y compararlo en dos escenarios:
 - 1) estadiaje ganglionar convencional con HE, versus
 - 2) estadiaje ganglionar mediante OSNA
- Determinar la viabilidad operativa de la realización de la estadificación molecular de CCR en un Servicio de Anatomía Patológica en el contexto asistencial.
- Demostrar la no inferioridad de la obtención del estadio pN con extensiones citológicas respecto al pN obtenido con HE convencional.
- Comparar el estadio pN obtenido de extensiones citológicas de los ganglios linfáticos de CCR con el pN convencional obtenido con HE, y con el resultado de la carga tumoral total obtenido por OSNA.

MATERIAL, METODOS **Y RESULTADOS**

La descripción de los pacientes, la metodología utilizada, así como los resultados obtenidos en los distintos estudios realizados, se encuentran detalladamente explicados en las secciones de “Materials and methods” y “Results” de cada uno de los dos artículos que constituyen el cuerpo de la presente tesis doctoral.

La versión publicada y disponible online de los dos artículos se incluye a continuación.

Estudio 1

Budget Impact Analysis of Molecular Lymph Node Staging Versus Conventional Histopathology Staging in colorectal Carcinoma

Sherley Diaz-Mercedes¹, Ivan Archilla¹, Jordi Camps²⁻³, Antonio de Lacy⁴, Iñigo Gorostiaga⁵, Dulce Momblan⁴, Ainitze Ibarzabal⁴, Joan Maurel⁶, Nuria Chic⁶, Josep Antoni Bombí¹, Francesc Balaguer²⁻³, Antoni Castells²⁻³, Iban Aldecoa¹⁻⁷, Josep Maria Borrás⁸, Miriam Cuatrecasas⁹⁻¹⁰⁻¹¹

1. Pathology Department-Center of Biomedical Diagnosis (CDB), Hospital Clínic, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036, Barcelona, Spain.
2. Gastroenterology Department, Hospital Clínic, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain.
3. CIBERehd and Banc de Tumors-Biobanc Clínic-IDIBAPS-XBTC, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.
4. Surgical Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.
5. Pathology Department, Araba University Hospital, Vitoria-Gasteiz, Spain.
6. Medical Oncology Department, Hospital Clínic of Barcelona, Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors Group, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
7. Neurological Tissue Bank of the Biobanc Clínic-IDIBAPS-XBTC, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.
8. Department of Clinical Sciences and Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
9. Pathology Department-Center of Biomedical Diagnosis (CDB), Hospital Clínic, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036, Barcelona, Spain. mcuatrec@clinic.cat.
10. Pathology Department, Araba University Hospital, Vitoria-Gasteiz, Spain. mcuatrec@clinic.cat.
11. CIBERehd and Banc de Tumors-Biobanc Clínic-IDIBAPS-XBTC, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. mcuatrec@clinic.cat.

Applied Health Economics and Health Policy 2019; 17:655-667

Factor de impacto: 2,561

Health Policy & Medicine (Q1)

RESUMEN

Antecedentes: La presencia de metástasis en los ganglios linfáticos (GLs) es un factor pronóstico crítico en pacientes con cáncer colorrectal (CCR), además de ser determinante de indicación de quimioterapia adyuvante. La técnica Gold Standar (GS) para realizar el estadio ganglionar (pN) se basa en el análisis histológico de los GLs con tinción de Hematoxilina y Eosina (HE), pero su sensibilidad es baja en estadios iniciales de la enfermedad. Como consecuencia, tras una cirugía de CCR con intención curativa, cabe la posibilidad de que el estadio ganglionar pN0 obtenido con HE sea un falso negativo, y que algunos pacientes tengan riesgo de progresión de la enfermedad y no se hayan podido beneficiar de un tratamiento adyuvante. La técnica One-Step-Nucleic-Acid-Amplification (OSNA) está automatizada y estandarizada para el análisis de GLs de rutina. Es cuantitativa, rápida y muy sensible, por lo que permite diagnosticar micrometástasis ganglionares no detectadas con HE. No obstante, el análisis molecular por OSNA es más caro que la HE, por lo que se decidió realizar un estudio de coste-efectividad del impacto económico de utilizar esta técnica para el análisis ganglionar en estadios II de CCR.

Objetivos: El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto presupuestario en el Sistema Nacional de Salud (SNS) español de la introducción del análisis de los GLs con la técnica OSNA en pacientes con CCR en estadio II.

Métodos: Se desarrolló un análisis del impacto presupuestario, comparando dos escenarios (GS vs OSNA) dentro del marco del Sistema Nacional de Salud (SNS) español durante un período de 3 años (2017-2019). Se calculó el coste de pacientes con CCR en estadio II, sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa. Se incluyeron los siguientes costos: cirugía inicial, diagnóstico patológico, estadificación, seguimiento, tratamiento sistémico y cirugía tras la recidiva.

Resultados: Debido a que los pacientes incurren en costes adicionales en los años posteriores al diagnóstico, sobre todo de seguimiento, la implementación del OSNA en el momento del diagnóstico permite un estadiaje ganglionar inicial con un alto valor predictivo negativo. Esto asegura que los pacientes pN0 sean reales y no requieran tratamiento adyuvante, tengan menos recidivas, e incluso podría ajustarse el seguimiento. Con el método GS de estadiaje pN con HE existen pacientes con estadios pN0 falsos que recidivan e incrementan los costes de seguimiento y tratamiento del CCR. El resultado del estudio concluyó que invertir más en el estadiaje pN inicial realizándolo con OSNA, supondría un ahorro en CCR en estadio II de 1.509.182 € en el primer año, 6.854.501 € en el segundo año y € 10.814.082 en el tercer año. El SNS hubiera ahorrado más de 19 millones de € en un plazo de 3 años.

Conclusiones: La introducción del método de OSNA para el análisis de los GLs de CCR en estadio II puede representar además de un beneficio económico para el SNS, un beneficio clínico para los pacientes, ya que se podría realizar una estadificación ganglionar más precisa que permitiría administrar terapia adyuvante a quien la precisa y evitaría tratamientos innecesarios.



Budget Impact Analysis of Molecular Lymph Node Staging Versus Conventional Histopathology Staging in Colorectal Carcinoma

Sherley Diaz-Mercedes¹ · Ivan Archilla¹ · Jordi Camps^{2,8} · Antonio de Lacy³ · Iñigo Gorostiaga⁴ · Dulce Momblan³ · Ainitze Ibarzabal³ · Joan Maurel⁵ · Nuria Chic⁵ · Josep Antoni Bombí¹ · Francesc Balaguer^{2,8} · Antoni Castells^{2,8} · Iban Aldecoa^{1,6} · Josep Maria Borrás⁷ · Miriam Cuatrecasas^{1,4,8}

Published online: 21 May 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

Background The presence of lymph node (LN) metastasis is a critical prognostic factor in colorectal cancer (CRC) patients and is also an indicator for adjuvant chemotherapy. The gold standard (GS) technique for LN diagnosis and staging is based on the analysis of haematoxylin and eosin (H&E)-stained slides, but its sensitivity is low. As a result, patients may not be properly diagnosed and some may have local recurrence or distant metastases after curative-intent surgery. Many of these diagnostic and treatment problems could be avoided if the one-step nucleic acid amplification assay (OSNA) was used rather than the GS technique. OSNA is a fast, automated, standardised, highly sensitive, quantitative technique for detecting LN metastases.

Objectives The aim of this study was to assess the budget impact of introducing OSNA LN analysis in early-stage CRC patients in the Spanish National Health System (NHS).

Methods A budget impact analysis comparing two scenarios (GS vs. OSNA) was developed within the Spanish NHS framework over a 3-year time frame (2017–2019). The patient population consisted of newly diagnosed CRC patients undergoing surgical treatment, and the following costs were included: initial surgery, pathological diagnosis, staging, follow-up expenses, systemic treatment and surgery after recurrence. One- and two-way sensitivity analyses were performed.

Results Using OSNA instead of the GS would have saved €1,509,182, €6,854,501 and €10,814,082 during the first, second and third years of the analysis, respectively, because patients incur additional costs in later years, leading to savings of more than €19 million for the NHS over the 3-year time horizon.

Conclusions Introducing OSNA in CRC LN analysis may represent not only an economic benefit for the NHS but also a clinical benefit for CRC patients since a more accurate staging could be performed, thus avoiding unnecessary treatments.

1 Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide, with nearly 1.8 million newly diagnosed cases in 2018, according to Globocan 2018 estimates [1]. In Spain, CRC was the most prevalent type of cancer in 2017, with

34,331 new cases diagnosed that year, and was the second leading cause of death by cancer in 2016 [2]. Over the last 30 years, improvements in early diagnosis and treatment have doubled the 5-year survival of CRC patients [3–6]; however, these improved outcomes have been costly and imposed a higher economic burden on health systems [7]. In 2016, the mean cost per CRC patient in Spain ranged from €9634 among in situ tumours to €41,550 for stage III patients. Over this same period, the global mean cost per patient was €28,741 [7].

Unless there are other factors that hinder the surgical procedure, surgical excision is the main approach for non-disseminated CRC [8]. The presence of lymph node (LN) metastasis is a critical prognostic factor for patients with CRC, and also determines the need for adjuvant chemotherapy treatment [9]. Pathological LN staging is considered the gold standard (GS), based on the evaluation of routine

Sherley Diaz-Mercedes and Ivan Archilla contributed equally.

Iban Aldecoa and Miriam Cuatrecasas contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s40258-019-00482-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Miriam Cuatrecasas
mkuatrec@clinic.cat

Extended author information available on the last page of the article

Key Points for Decision Makers

Lymph node (LN) staging is based on conventional gold-standard pathology, which analyses <1% of the LN.

LN micrometastases may not be detected by haematoxylin and eosin due to tumour allocation bias, and may cause tumour recurrences.

A more accurate LN staging using the one-step nucleic acid amplification molecular assay could allow a better patient management, and only patients at risk of recurrence would be treated. Savings per patient in unneeded procedures and chemotherapy treatments stretch over the years, and may represent an important economic benefit for the National Health Service.

haematoxylin and eosin (H&E)-stained slides; however, evidence indicates that it is not the best methodology of LN staging [10–13]. Significant limitations of this technique are its low sensitivity, since only a small part of the LN is examined [10, 14–18], and the fact that it is a morphology-based analysis [19]. The American Joint Committee on Cancer established that at least 12 LNs should be analysed to assure a reliable pathologic pN0 assessment [20]. Therefore, undetected metastases within the unsampled material may be the cause of an increased risk of local recurrence and/or distant metastases after curative-intent surgery [19]. Yamamoto et al. reported that 6 of 83 OSNA-positive LNs were diagnosed as negative by H&E and immunohistochemical staining (7.2%) [9]. Other studies report that local recurrence or distant metastases occur in between 10 and 30% of CRC patients after surgical tumour resection [6, 14, 16, 18]. Moreover, stage II CRC patients with occult LN metastasis are considered a high-risk group for disease recurrence [15], and between 10 and 25% of these patients die from disease [6, 21]. Therefore, missed LN metastases with the GS method might cause disease understaging, leading to the undertreatment of patients [19].

An innovative technique called one-step nucleic acid amplification assay (OSNA) has been introduced in some hospitals in Europe and within the Asia-Pacific region for detecting LN metastases in patients with breast cancer. OSNA is a quantitative *in vitro* diagnostic molecular assay system, designed to measure the amount of tumoural cytokeratin 19 (CK19) messenger RNA (mRNA) within LNs [9, 22]. With OSNA, the LN total tumour burden or total tumour load is defined as the sum of all CK19 mRNA copies present in all dissected LNs of a given case [15, 23]. The total tumour load has already been implemented in routine clinical practice for breast cancer patients, allowing patients to be classified into low- and high-risk groups,

independently of the pathologic pN stage and other prognostic factors. In breast cancer, the total tumour load has become a predictive factor for progression. It is related to patient outcome and has become a tool for patient management and decision making [24].

One of the innovative aspects of OSNA is that, unlike the GS technique, OSNA can analyse the whole LN in a short time frame, and in an automatic and standardised way [22]. OSNA is already being used for intraoperative sentinel LN diagnosis in breast carcinoma [23], and has been demonstrated to be a time-efficient tool with standardised assessment of LNs [19]. A CRC meta-analysis including five studies compared the cut-off point of OSNA versus the GS and demonstrated an average sensitivity of 89.4% and specificity of 93.3% [19]. In addition, the OSNA assay is faster than the GS technique; OSNA takes 30–40 min to analyse all LNs from two patients, compared with the several hours required for GS analysis [18].

In breast cancer, Saruta and Puig-Junoy estimated savings of US\$346 per patient over a 5-year period when OSNA was used intraoperatively instead of conventional intraoperative sentinel LN biopsy [25]. The National Institute for Health and Care Excellence (NICE) assessed OSNA for CRC staging and estimated an average cost per patient (including capital, maintenance, and disposable costs) of between £568 and £608 (excluding value-added tax), depending on the cost of disposables (re-agents and consumables) [22]. Nevertheless, budget impact studies of OSNA for CRC staging are lacking, highlighting the need for economic evaluations assessing OSNA in this patient population. The present study performed a budget impact analysis of OSNA in CRC patients in Spain, comparing two scenarios—GS and OSNA.

2 Materials and Methods

2.1 Perspective and Time Horizon

A ‘what-if’ budget impact analysis of introducing OSNA to perform LN analysis in CRC patients in the Spanish National Health System (NHS) was developed using the SensIt program (a sensitivity analysis add-in for Microsoft® Excel 2007–2013 [Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA]). The analysis was performed from the NHS perspective. Costs were calculated annually, corresponding to the number of patients newly diagnosed with CRC undergoing surgery during the first year, over a 3-year time horizon from 2017 to 2019. As recommended in budget impact analyses by the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research (ISPOR) [26] and by a Spanish pharmacoeconomic guideline [27], costs were not discounted. This analysis follows the ISPOR principles of Good Practice Framework [26].

2.2 Features of the Spanish Health Care System

The Spanish NHS is a decentralised system covering 17 Spanish regions [28]. Medical procedures, tests and drugs administered in the hospital setting are totally covered by the Spanish health services. In Spain, medical devices are normally acquired by tendering procedures.

2.3 Eligible Population

The cohort of patients included in the present analysis comprised Spanish patients diagnosed with CRC who underwent curative-intent surgical excision. Inclusion criteria were patients over 18 years of age with primary histologically confirmed colon carcinoma and positive CK19 immunohistochemistry. Exclusion criteria were based mainly on technical reasons, i.e., open colectomies were excluded due to the risk of CK19 contamination from normal mucosa to LNs that did not contain CK19. Surgical specimens that were fixed in formalin were also excluded since the OSNA assay must be performed on fresh tissue. Rectal tumours treated with neoadjuvant therapy were excluded for the intrinsic difficulty of LN dissection after therapy. Cases with extensive fat infiltration were excluded since LNs cannot be identified and dissected in the middle of primary infiltrating tumour. The analysis was performed based on the estimated patient subgroups according to the recruitment performed by Rakislova et al. regarding systemic therapy (ST) administration [18].

The patient cohort included in the study was obtained from Globocan data (34,331 estimated new cases of CRC in Spain) [29], taking into account that 70.7% of patients diagnosed with CRC will undergo surgery, as reported by Corral et al. [7]. In our study, the target population was further reduced, and only 74.1% of surgically treated patients could be included for LN OSNA analysis once the exclusion criteria detailed above were applied. The size of the target population was assumed to be constant over the 3-year time horizon.

2.4 Interventions

Clinical schemes used to populate the model follow CRC National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines [20], which are in line with Spanish clinical practice (Fig. 1). The treatment of choice for stage 0, I, II, or III CRC patients is surgical excision. After surgery, depending on tumour (pT) and LN status (pN) stage, some patients were treated with ST, consisting of different chemotherapy (QT) regimens [30–37]. LN analysis performed using the GS technique implies a risk of misdiagnoses, leading to undertreatment. Undertreated patients may have a higher

risk for disease recurrence. According to guidelines, patients showing CRC recurrence might be treated with ST and/or surgery. ST after recurrence consists of QT regimens, which can include biological agents. The OSNA assay detection starts at 250 copies/ μ L, below 250 copies it is considered negative, allowing the selection of those patients who will very unlikely have tumoural cells in their LNs. However, the OSNA values and the clinical significance do not exactly correlate, and the presence of OSNA positivity does not imply a negative biological effect or patient recurrence by itself. A cut-off of 7500 copies/ μ L has been found to be related to a higher risk of recurrence and worse prognosis [19, 38]. Therefore, the threshold used in this study was 7500 copies/ μ L; OSNA values $\geq$ 7500/ μ L should be considered a positive result.

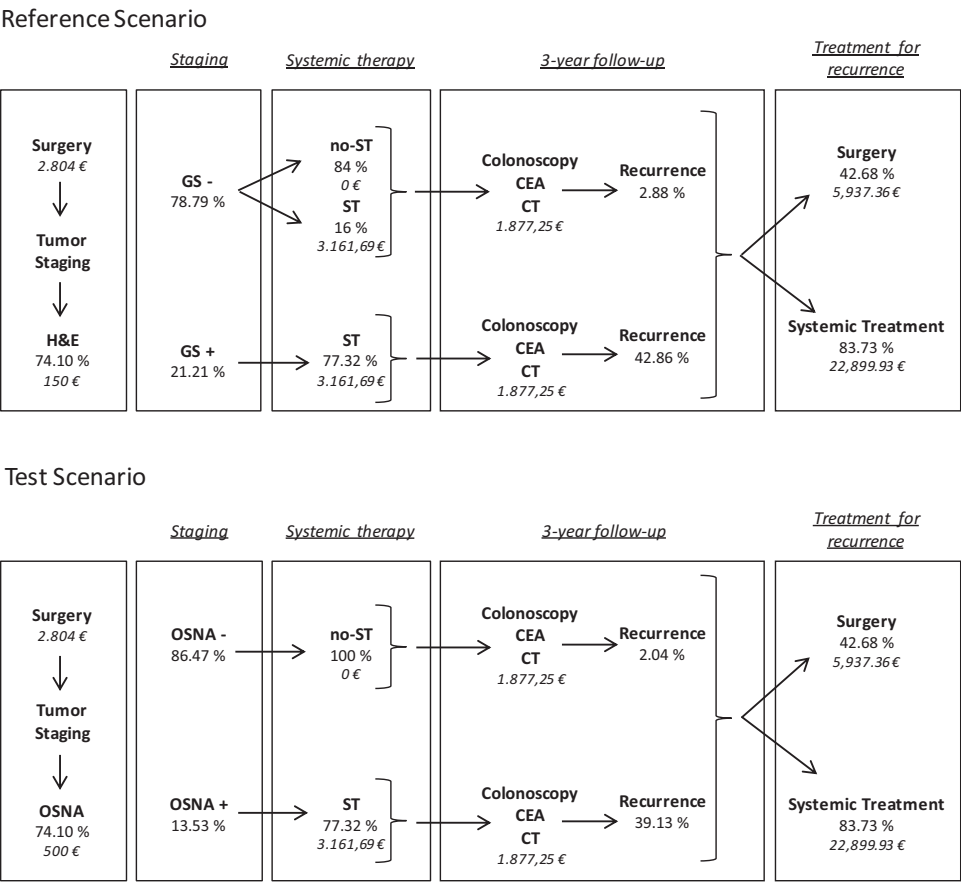
2.5 Scenarios and Model Description

The model compares a reference scenario versus a test scenario over a 3-year time horizon. The reference scenario assesses the management cost of CRC patients whose LNs have been analysed using the GS technique (H&E staining), while the test scenario estimates the management cost of CRC patients if LN analysis had been performed using the OSNA technique in the Spanish NHS framework (Fig. 1). Incident patients diagnosed during the first year of the analysis would be followed over the 3-year time horizon in order to collect costs associated with CRC disease.

The proportion of patients with positive or negative LNs, and the proportion of patients receiving ST after a positive or negative LN analysis, differs between scenarios (Fig. 1). In the reference scenario, 78.79% of patients showed negative LNs using the GS technique [18], of which 15.99% were treated with ST according to data obtained from three different studies [39–41]. Some negative LN patients were treated based on decisions taken on multidisciplinary committees or recommendations made by clinical guidelines such as the NCCN.

In the reference scenario, 77.32% of patients with positive LNs by GS received ST [39, 41]. The model assumes that all patients with negative LNs analysed using the OSNA technique (86.47%) would not receive ST, while 77.32% of patients with a positive OSNA result (cut-off of $>$ 7500 copies/ μ L; 13.53%) would be treated with ST. Patients with no ST would enter the follow-up period after surgery, while patients receiving ST would enter the follow-up period after adjuvant treatment. During the first year of follow-up, 98.10% and 98.82% of patients in the reference and test scenarios, underwent and would undergo, respectively, colonoscopies, medical visits, blood tests (including monitoring of carcinoembryonic antigen; CEA) and computed tomography (CT) scans. The proportion of patients using

Fig. 1 Budget impact scenarios. *CEA* carcinoembryonic antigen, *CT* computed tomography, *€* Euros, *GS* gold standard, *OSNA* one-step nucleic acid amplification assay, *ST* systemic therapy



the latter healthcare resources in the reference and test scenarios would be 96.21% and 97.64%, respectively, during the second year, and 92.42% and 95.29%, respectively, during the third year. The frequency of tests and visits is described in Table 1.

The percentage of patients with recurrence was obtained from a recently published study comparing GS and OSNA over a 2-year period [18]. Recurrence rates observed by Rakislova et al. [18] during the 2-year period are assumed to be maintained during the third year of the analysis for both the GS and OSNA techniques. In both scenarios, 42.68% of recurrent patients underwent surgery for recurrence and 83.73% received ST for recurrence each year of the analysis [40].

2.6 Input Data

Assumed parameter values for all clinical and cost data for both scenarios are shown in Table 1, and the strengths, weaknesses and potential data biases are described in electronic supplementary Table S1. We conducted a search of the Pubmed and eSalud electronic databases using different combinations of keywords, such as ‘OSNA’, ‘colorectal cancer’, ‘National Health System’ and ‘costs’. Data credibility

was assessed as described in the data extraction protocol (electronic supplementary Table S2).

2.7 Costs

The present analysis only includes direct costs from 2017, with all costs given in Euros (€). Drug costs were calculated based on the ex-factory price (PVL, Spanish acronym for Precio de Venta del Laboratorio) [42]. Daily defined doses were obtained from the summary of product characteristics of each drug, and from clinical trials if not specified in the summary of product characteristics. The daily dose per patient was calculated considering an average weight and height of 70.2 kg and 166 cm, respectively [43]. Regarding drugs administered intravenously, vial wastage was assumed. The cost of ST following first surgery is the average cost of the common QT regimens used in clinical practice, and the cost of ST after recurrence is an average value of the cost of the QT regimens and biological agents (Table 2). An outlier detection technique was used when calculating the average cost of ST, excluding those QT regimens with an annual cost under the average cost divided by two. The cost of other health resources used, such as medical visits and tests, were obtained from the Spanish health costs database [44].

Table 1 Inputs used for the base-case and sensitivity analyses

Parameters	Inputs	References	Range (lowest–highest)
CRC incidence (<i>N</i>)	34,331	[54]	10–521,490
Lymph node (<i>N</i>)	15.00	[55]	10.00–27.00
GS-negative (%)	78.79	[9, 18, 39]	66.14–100
GS-positive (%)	21.21	[9, 16, 18]	0.00–33.89
GS-negative, no ST (%)	84.01	[39–41]	79.69–100
GS-negative, ST (%)	15.99	[9, 39, 40]	12.20–20.30
GS-positive, ST (%)	77.32	[9, 39]	62.64–92.00
OSNA-negative (%)	86.47	[16, 18]	61.27–100
OSNA-positive (%)	13.53	[16, 18]	0.00–33.85
OSNA-negative, no ST (%)	100.00	[20]	79.69–100.00
OSNA-positive, ST (%)	77.32	[39, 40]	62.64–92.00
Recurrence GS-negative (%)	1.92	[18, 56]	0.00–1.92
Recurrence GS-positive (%)	28.57	[18, 56]	0.00–28.57
ST for recurrence GS (%)	83.73	[40]	0.00–100.00
Surgery for recurrence GS (%)	42.68	[40]	0.00–100.00
Recurrence OSNA-negative (%)	1.36	[18, 56]	0.00–1.36
Recurrence OSNA-positive (%)	26.09	[18, 56]	0.00–26.09
ST for recurrence OSNA (%)	83.73	[40]	0.00–100.00
Surgery for recurrence OSNA (%)	42.68	[40]	0.00–100.00
Recurrence GS (%) ^a	3.79	[18]	0.00–7.58
Recurrence OSNA (%) ^a	2.36	[18]	0.00–4.71
Hospitalisation days (<i>N</i>)	7.00	[57]	1–14
Blood test, CEA, visits (<i>N</i>)	4.00	[20]	2.00–8.00
Abdominal CT (<i>N</i>)	1.00	[20]	1.00–3.00
Thoracoabdominal CT (<i>N</i>)	1.00	[20]	0.00–2.00
Colonoscopy (<i>N</i>)	1.00	[20]	0.00–2.00
Surgery after diagnosis (€)	2804.00	[44]	1402.00–5608.00
GS (cost per lymph node; €)	10.00	[44]	5.00–20.00
OSNA (cost per patient; €)	500.00	[58] ^b	250–700
Hospitalisation daily cost (€)	347.00	[44]	112.00–582.00
ST after first surgery (€)	2293.66	[20, 42, 43, 56, 59–65]	687.91–3739.75
Colonoscopy (€)	235.51	[44]	120.00–285.00
CEA (€)	29.00	[44]	20.00–38.00
Blood test (€)	99.19	[44]	46.78–184.89
Thoracoabdominal (€)	134.33	[44]	73.00–165.00
Abdominal CT (€)	135.00	[44]	62.00–168.00
Medical visit (€)	26.57	[44]	21.60–29.88
ST after recurrence (€)	21,966.71	[20, 42, 43, 59–73]	687.91–32,538.31
Surgery for recurrence (€)	5937.00	[44]	5038.00–7252.00

CEA carcinoembryonic antigen, CRC colorectal cancer, CT computed tomography, GS gold standard, *N* number of patients, OSNA one-step nucleic acid amplification assay, ST systemic therapy, € Euros

^aRefers to the overall recurrence rate during the first year in both scenarios, independently of the results obtained

^bData provided by the manufacturer

2.8 Sensitivity Analyses

A one-way sensitivity analysis (OWSA) was performed in order to assess the uncertainty and robustness of the model. Clinical and cost parameters were increased and decreased

according to the minimum and maximum values shown in Table 1, which were mostly obtained from the literature. For the purposes of sensitivity analyses, the lowest (Vanuatu) and highest (China) number of possible incident patients worldwide was considered [29].

In addition, a two-way sensitivity analysis (TWSA) was performed to further assess the uncertainty regarding those clinical parameters that were correlated and should be simultaneously varied; varying them independently may show misleading results: ‘positivity of GS vs. OSNA’, ‘recurrence in follow-up: GS vs. OSNA’, ‘recurrence in ST: GS vs. OSNA’ and ‘ST after recurrence with GS vs. OSNA’.

3 Results

3.1 Target Population

The number of patients diagnosed with CRC who underwent surgery was estimated as 24,265 per year, of which 17,980 would be eligible for OSNA. In the reference scenario, 5214 patients would receive ST after surgery, whereas in the test scenario, only OSNA-positive patients (1615) would receive ST after surgery. More patients in the reference scenario (1362) recurred than in the test scenario (727), and, after recurrence, fewer patients in the test scenario would undergo surgery (310 vs. 581) and receive ST compared with the reference scenario (608 vs. 1140).

3.2 Budget Impact After the Introduction of the One-Step Nucleic Amplification Technique

The overall cost of the reference scenario for the first, second and third years was estimated at €182,711,803, €52,101,734 and €62,878,813, respectively, while in the test scenario, the overall cost for the first, second and third years was €181,202,621, €45,247,233 and €52,064,732, respectively. From these results, the corresponding savings were estimated to be €1,509,182 in year 1, €6,854,501 in year 2, and €10,814,082 in year 3, corresponding to savings of 0.002%, 0.010% and 0.016% in the Spanish public health expenditure in 2014 (€66,826 million) [45]. Therefore, the introduction of OSNA in Spanish clinical practice for performing LN analysis from CRC surgical specimens could lead to an overall cost saving of €19,177,765 for the Spanish NHS over a 3-year time horizon (Table 3).

The overall cost per patient using the GS or OSNA techniques is estimated to be €13,193 and €12,126, respectively. Therefore, cost savings of €1067 per patient for the next 3 years after CRC diagnosis are achievable if the OSNA technique replaced the GS technique in the Spanish NHS.

3.3 Sensitivity Analyses

Results obtained from the OWSA and TWSA show the robustness of the analysis performed and confirm the results obtained (Figs. 2, 3, respectively). The parameters with a

higher impact on the results are those relating to the proportion of patients with negative results, using both the GS and OSNA techniques, and the treatment cost after diagnosis and recurrence. The results obtained by reducing and increasing the parameters included in the analysis are in line with the base-case results, therefore generating savings for the Spanish NHS if OSNA was introduced in clinical practice (Fig. 2). Figure 3 shows that in each of the four analyses, the base case is located within the area under the line, where savings for the NHS would be expected. Lines drawn in Fig. 3 show simultaneous variations of the two parameters included in each analysis.

4 Discussion

This study focuses on a novel way of assessing the economic impact of the use of OSNA instead of the traditional GS technique for CRC patients in Spain. Our results indicate that the Spanish NHS would have saved over €19 million from 2017 to 2019 if OSNA had been introduced in clinical practice for surgically treated CRC patients. Savings are explained by the fact that OSNA ensures a more accurate diagnosis in CRC patients, allowing a reduction in treatment costs after initial surgery, as well as costs of adjuvant treatments and surgery after recurrence, compared with GS techniques. Although patients’ LN staging is more expensive with OSNA than with GS, savings regarding treatment costs after surgery and treatment costs due to recurrence are high enough to make a return on the investment made by the incorporation of OSNA at the diagnostic stage. Savings have already been observed during the first year, and increase during the second and third years of the analysis. Sensitivity analyses showed the robustness of the analysis. The number of incident patients is the variable showing a higher impact on the result in the OWSA (the higher the patient population, the greater the savings for the NHS). According to Globocan data [29], the countries reporting the lowest and highest crude incidence rate for CRC are Gambia and Japan, respectively. If these incidence rates were applied to the Spanish population, the number of incidence cases per year would be approximately between 238 and 54,404.

A previous study performed with breast cancer patients in Japan over a 5-year time horizon showed that the use of OSNA would lead to relevant Japanese healthcare savings of approximately US\$121,877,910 [25]. In addition to the difference of diagnosis, treatment and follow-up, the influence of pathological nodal staging on treatment decision in breast cancer and CRC is different. In CRC, the aim is to pursue those cases at risk of recurrence, while in breast carcinoma, a surgical decision of performing lymphadenectomy is undertaken, which does not depend on pathological

Table 2 Systemic treatments considered following the first surgery and after recurrence

	Molecule	Dose per cycle	No. of cycles per year	Cost per cycle (€)	Annual cost (€)
<i>ST following first surgery; clinical data sources</i>					
Capecitabine [37]	Capecitabine	35,000 mg/m ²	8	116.13	929.04
CAPOX ^a [31, 35, 36]	Capecitabine	28,000 mg/m ²	4	410.80	1643.22
	Oxaliplatin	130 mg/m ²			
CAPOX ^a [31, 35, 36]	Capecitabine	28,000 mg/m ²	8	410.80	3286.43
	Oxaliplatin	130 mg/m ²			
Fluorouracil/leucovorin (bimonthly) [30, 32–34, 60]	Fluorouracil	400 mg/m ²	12	57.33	687.91
	Fluorouracil	1200 mg/m ²			
	Leucovorin	200 mg/m ²			
FOLFOX4 ^b [30, 31, 35, 36, 60]	Oxaliplatin	85 mg/m ²	6	311.65	1869.87
	Leucovorin	200 mg/m ²			
	Fluorouracil	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	2400 mg/m ²			
FOLFOX4 ^b [30, 31, 35, 36, 60]	Oxaliplatin	85 mg/m ²	12	311.65	3739.75
	Leucovorin	200 mg/m ²			
	Fluorouracil	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	2400 mg/m ²			
<i>ST for recurrence; clinical data sources</i>					
Bevacizumab/CAPOX [69, 74]	Bevacizumab	7.5 mg/kg	12	1733.60	20,803.25
	CAPOX ^a				
Bevacizumab/FOLFOX6 [69]	Bevacizumab	5 mg/kg	12	1634.45	19,613.35
	FOLFOX6 ^b				
Bevacizumab/FOLFIRI [68–70]	Bevacizumab	5 mg/kg	12	1453.40	17,440.75
	Irinotecan	360 mg/m ²			
	Leucovorin	800 mg/m ²			
	Fluorouracil	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	4800 mg/m ²			
Bevacizumab/FOLFOXIRI [68]	Bevacizumab	5 mg/kg	12	1682.02	20,184.27
	Irinotecan	165 mg/m ²			
	Oxaliplatin	85 mg/m ²			
	Leucovorin	200 mg/m ²			
	Fluorouracil	3200 mg/m ²			
Cetuximab/FOLFOX6 [69]	Cetuximab	500 mg/m ²	12	2111.56	25,338.67
	FOLFOX6 ^b				
Cetuximab/FOLFOX6 [69]	Cetuximab	650 mg/m ²	12	2711.53	32,538.31
	FOLFOX6 ^b				
Cetuximab/FOLFIRI [69]	Cetuximab	500 mg/kg	12	1930.51	23,166.07
	Irinotecan	180 mg/m ²			
	Leucovorin	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	2400 mg/m ²			
Cetuximab/FOLFIRI [69]	Cetuximab	400 mg/m ²	12	2530.51	30,365.71
	Irinotecan	180 mg/m ²			
	Leucovorin	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	2400 mg/m ²			

Table 2 (continued)

	Molecule	Dose per cycle	No. of cycles per year	Cost per cycle (€)	Annual cost (€)
Panitumumab/FOLFIRI [75]	Panitumumab	6 mg/kg	12	1958.95	23,507.35
	Irinotecan	180 mg/m ²			
	Leucovorin	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	400 mg/m ²			
	Fluorouracil	2400 mg/m ²			
Panitumumab/FOLFOX6 [72]	Panitumumab	6 mg/kg	12	2140.00	25,679.95
	FOLFOX6	^b			

ST systemic therapy, € Euros

^aTreatment regimen includes the same molecules and doses per cycle indicated for CAPOX

^bTreatment regimen includes the same molecules and doses per cycle indicated for FOLFOX4

Table 3 Results of the budget impact of introducing OSNA in Spanish clinical practice over a 3-year time horizon (Euros)

	Year 1		Year 2		Year 3	
	Reference scenario (GS)	Test scenario (OSNA)	Reference scenario (GS)	Test scenario (OSNA)	Reference scenario (GS)	Test scenario (OSNA)
Surgery	126,983,355	126,983,355	0.00	0.00	0.00	0.00
Staging	2,697,072	8,990,240	0.00	0.00	0.00	0.00
ST after first surgery	11,959,135	4,314,396	0.00	0.00	0.00	0.00
Follow-up	33,114,221	33,355,561	31,856,889	32,565,720	30,628,249	31,789,382
Recurrence surgery	1,691,066	1,606,289	1,658,940	1,040,519	1,626,814	1,028,025
ST after recurrence	6,266,955	5,952,781	18,585,905	11,640,994	30,623,750	19,247,325
Total cost	182,711,803	181,202,621	52,101,734	45,247,233	62,878,813	52,064,732
Budget impact	1,509,182		6,854,501		10,814,082	

GS gold standard, OSNA one-step nucleic acid amplification assay, ST systemic therapy

nodal staging. Therefore, these results do not directly relate/ correspond to those obtained in the present study.

Several authors agree on using more sensitive molecular methods of LN staging in CRC, rather than GS [11, 12, 46–49], to help identify CRC patients who are histologically LN-negative after a potentially curative surgical resection and who are nevertheless at risk of recurrence [12, 47, 48]. Precise pathological LN staging is critical in determining the most suitable treatment [50, 51]. Nevertheless, not only are new techniques needed to achieve better patient staging but also new treatments with improved outcomes, as efficacy observed with current chemotherapy regimens for CRC is limited [52].

The results of the present study relate to Spain, however the OSNA technique could also be incorporated in other countries. Further studies comparing clinical outcomes such as recurrence rates or overall survival between patients whose LNs have been analysed using the OSNA technique versus the GS technique would be of interest. Moreover, although this study reports a relevant economic benefit for the Spanish NHS in a scenario using OSNA, further

pharmacoeconomic evaluations, such as cost-effectiveness analysis, could also help health services make informed decisions regarding the feasibility of introducing OSNA in their clinical practice.

4.1 Limitations

Pharmacoeconomic studies are subject to limitations, mainly due to the fact that reality ought to be simplified in order to elaborate the model. The present analysis assumed that the size of the target population remained unchanged over the 3-year period in order to collect all costs associated with the incident cohort. At the time of the study, no data were available regarding the mortality rates compared between OSNA and GS. Furthermore, clinical data used to calculate the proportion of patients with negative and positive results in the reference and test scenarios were taken from different studies including a sample of patients, which might differ from real clinical practice in Spain. However, inputs regarding the staging and recurrence rates of patients were obtained from the same study for consistency. Additionally, the proportion

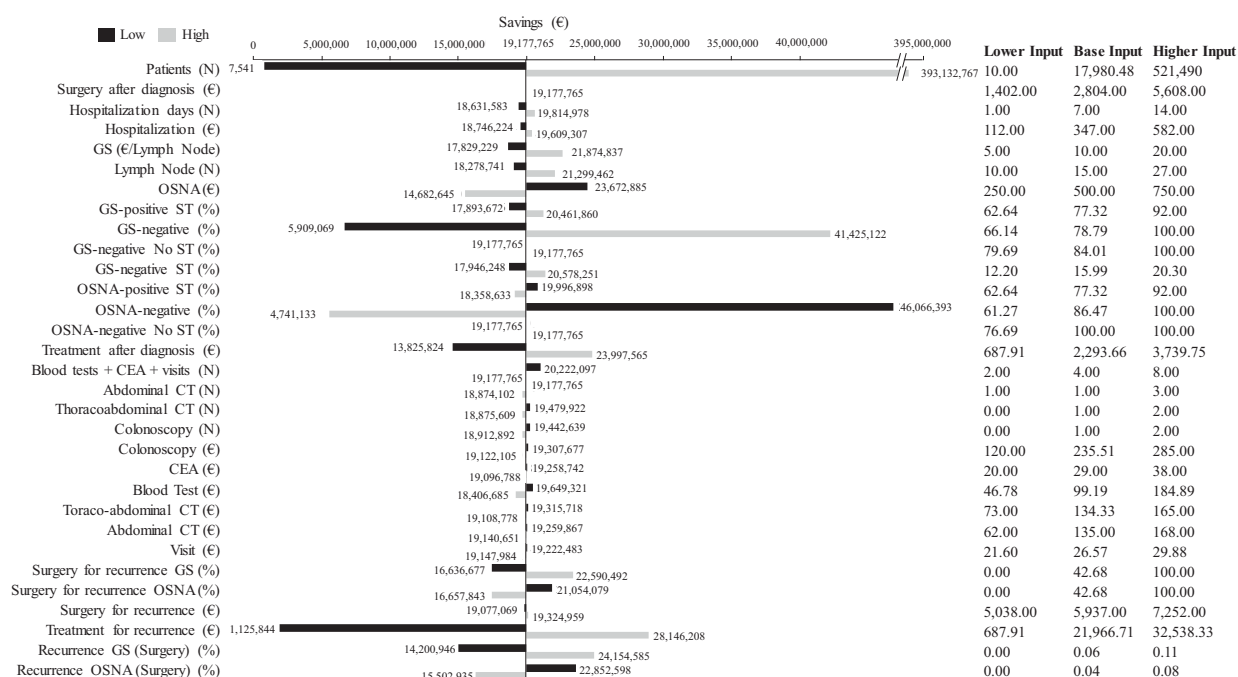


Fig. 2 Tornado diagram, one-way sensitivity analysis results. Vertical line indicates the total cost saving from the base case, and the horizontal lines indicate the shift in the range of outputs obtained by varying each input to a lower (black) and higher (light grey) value.

CEA carcinoembryonic antigen, CT computed tomography, GS gold standard, N number of patients, OSNA one-step nucleic acid amplification assay, ST systemic therapy, € Euros

of negative and positive OSNA results might be associated with sample bias in the study design, which was performed according to the actual guidelines of LN analysis and staging in CRC. To date, all CRC studies performed using OSNA have the same sample bias, resulting from using part of the LNs for H&E analysis and GS staging, and using the rest for OSNA. Consequently, metastasis might have only been present in part of the H&E analysis, leading to false negative OSNA results [17, 18, 53].

Furthermore, another limitation is in regard to data obtained from Rakislova et al. [18], as LNs were analysed using both the GS and OSNA techniques, and treated according to the GS diagnosis. Therefore, patient outcomes remain unknown in the hypothetical case that patients' treatment decisions would have only been based on the OSNA results. Hence, a randomised study is needed to obtain accurate outcomes in those patients treated after the OSNA results had been reported and those treated after GS diagnosis, in order to assess a possible differential treatment effect depending on the staging diagnostic procedure performed, i.e., OSNA or GS. Costs related to adverse effects and adverse events management were not included in both interventions since

they are the same for both OSNA and GS. Diagnosis is performed after tissue containing the tumour is resected from the patient. Therefore, patients do not undergo extra interventions as LN analysis is performed in the laboratory, with no adverse events for the patient. Thus, adverse events relating to diagnostic techniques for CRC have not been identified.

5 Conclusions

The introduction of OSNA for the management of CRC patients in Spanish clinical practice may represent an economic benefit for the NHS, as well as clinical benefit for CRC patients. OSNA results offer higher diagnostic reliability than the currently used GS techniques. The introduction of OSNA may allow more accurate staging of patients, which could help in avoiding unnecessary treatments without affecting a patient's prognosis (recurrence), or may provide the opportunity to receive treatment for those patients who could really benefit from it.

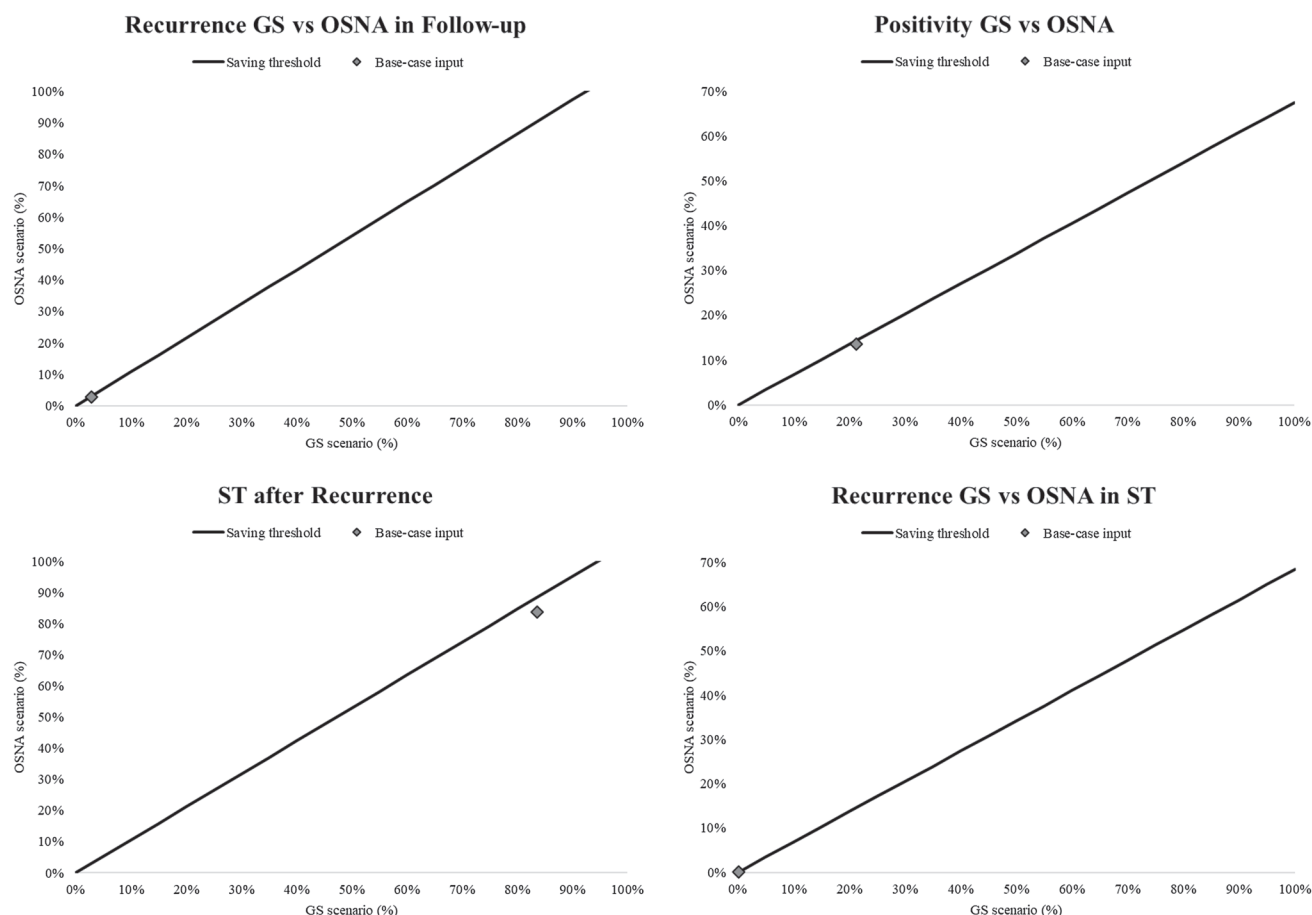


Fig. 3 Two-way sensitivity analysis results. *GS* gold standard, *OSNA* one-step nucleic acid amplification assay, *ST* systemic therapy

Acknowledgements The authors acknowledge Clara Carrascosa for her technical support, and Sysmex Coop Spain (Sant Just Desvern, Spain) for the technical advice and support provided.

Compliance with Ethical Standards

Funding This work was supported by Grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI17/01304), Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (GCB13131592CAST), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-54453-R), and Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2017SGR653 and 2017SGR00735), as well as by the Banc de Tumors-Biobanc Hospital Clinic-IDIBAPS and Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III. The authors also acknowledge the support of the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya.

Author contributions MC, IAr, JMB, SD-M, IAI, and AC contributed to the conception and planning of the work that led to the manuscript; acquisition, analysis and interpretation of the data; drafting and/or critical revision of the manuscript for important intellectual content; and approval of the final version of the submitted manuscript. AI, AdL, DM, FB, IG, JAB, JC, JM, and NC contributed to the acquisition, analysis and interpretation of the data, and approval of the final version of the submitted manuscript.

Data availability statement Data are available from the authors upon reasonable request.

Conflict of interest Sherley Diaz-Mercedes, Ivan Archilla, Jordi Camps, Antonio de Lacy, Iñigo Gorostiaga, Dulce Momblan, Ainitze Ibarzabal, Joan Maurel, Nuria Chic, Josep Antoni Bombí, Francesc Balaguer, Antoni Castells, Iban Aldecoa, Josep Maria Borrás and Miriam Cuatrecasas declare no conflicts of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.

2. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las Cifras del Cáncer en España. 2018.
3. Globocan, International Agency for Research on Cancer. World Cancer Fact Sheet. GLOBOCAN. 2013 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Accessed 6 Sept 2018.
4. Office for National Statistics. Cancer survival in England—adults diagnosed: 2008–2012, followed up to 2013 London: Office for National Statistics; 2014.
5. Rachet B, Maringe C, Nur U, Quaresma M, Shah A, Woods LM, et al. Population-based cancer survival trends in England and Wales up to 2007: an assessment of the NHS cancer plan for England. *Lancet Oncol*. 2009;10(4):351–69.
6. Pahlman LA, Hohenberger WM, Matzel K, Sugihara K, Quirke P, Glimelius B. Should the benefit of adjuvant chemotherapy in colon cancer be re-evaluated? *J Clin Oncol*. 2016;34(12):1297–9.
7. Corral J, Castells X, Molins E, Chiarello P, Borrás JM, Cots F. Long-term costs of colorectal cancer treatment in Spain. *BMC Health Serv Res*. 2016;16:56.
8. Valentini V, Aristei C, Glimelius B, Minsky BD, Beets-Tan R, Borrás JM, 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.
9. Compton CC. Optimal pathologic staging: defining stage II disease. *Clin Cancer Res*. 2007;13(22):6862s–70s.
10. 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.
11. Hyslop T, Waldman SA. Molecular staging of node negative patients with colorectal cancer. *J Cancer*. 2013;4(3):193.
12. 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. *J Clin Oncol*. 2011;30(1):60–70.
13. Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, et al. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Cancer Res*. 1999;5(7):1830–6.
14. Croner RS, Geppert CI, Bader FG, Nitsche U, Spath C, Rosenberg R, et al. Molecular staging of lymph node-negative colon carcinomas by one-step nucleic acid amplification (OSNA) results in upstaging of a quarter of patients in a prospective, European, multicentre study. *Br J Cancer*. 2014;110(10):2544–50.
15. 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.
16. Vogelaar FJ, Reimers MS, van der Linden RL, van der Linden JC, Smit VT, Lips DJ, 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.
17. Aldecoa I, Ates 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 Arch*. 2016;469(4):385–94.
18. 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):14.
19. Wild JB, Iqbal N, Francombe J, Papettas T, Sanders DS, Ramcharan S. Is it time for one-step nucleic acid amplification (OSNA) in colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Tech Coloproctol*. 2017;21(9):693–9.
20. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines for Patients: Colon Cancer. National Comprehensive Cancer Network; 2016, 2017. Available at: <https://www.nccn.org>.
21. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet*. 2005;365(9454):153–65.
22. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). OSNA for colon cancer staging. 2016. <https://www.nice.org.uk/advice/mib77/resources/osna-for-colon-cancer-staging-pdf-63499352498629>. Accessed 24 July 2018.
23. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antunez 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.
24. Peg V, Sansano I, Vieites B, Bernet L, Cano R, Córdoba A, et al. Role of total tumour load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients. *Breast*. 2017;33:8–13.
25. Saruta Y, Puig-Junoy J. Cost and budget impact analysis of an accurate intraoperative sentinel lymph node diagnosis for breast cancer metastasis. *Appl Health Econ Health Policy*. 2016;14(3):323–35.
26. Sullivan SD, Mauskopf JA, Augustovski F, Jaime Caro J, Lee KM, Minchin M, et al. Budget impact analysis—principles of good practice: report of the ISPOR 2012 Budget Impact Analysis Good Practice II Task Force. *Value Health*. 2014;17(1):5–14.
27. Puig-Junoy J, Oliva-Moreno J, Trapero-Bertran M, Abellán-Perpiñán JM, Brosa-Riestra M, Servei Català de la Salut (Cat-Salut). Guia i recomanacions per a la realització i presentació d'avaluacions econòmiques i anàlisis d'impacte pressupostari de medicaments en l'àmbit del CatSalut. Barcelona: Generalitat de Catalunya. Departament de Salut. Servei Català de la Salut; 2014.
28. MSSSI. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Informe Anual del Sistema Nacional de Salud. 2017. <https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnSNS.htm>. Accessed 25 July 2018.
29. GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Accessed 23 July 2018.
30. André T, De Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. *J Clin Oncol*. 2015;33(35):4176–87.
31. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, et al. Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1177–88.
32. Group QC. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007;370(9604):2020–9.
33. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1465–71.
34. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol*. 2007;25(16):2198–204.
35. Shah MA, Renfro LA, Allegra CJ, André T, De Gramont A, Schmoll H-J, et al. Impact of patient factors on recurrence risk and time dependency of oxaliplatin benefit in patients with colon cancer: analysis from modern-era adjuvant studies in the adjuvant colon cancer end points (ACCENT) database. *J Clin Oncol*. 2016;34(8):843.

36. Tournigand C, André T, Bonnetain F, Chibaudel B, Lledo G, Hickish T, et al. Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the multicenter international study of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin in the adjuvant treatment of colon cancer trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):3353–60.
37. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H III, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(26):2696–704.
38. Cuatrecasas M. Budget impact of molecular lymph node staging in colorectal carcinoma. Should we invest more in diagnosis? 30th European Congress of Pathology. *Virchows Arch*. 2018;473(Suppl 1):S1–340.
39. Bilchik A, Nissan A, Wainberg Z, Shen P, McCarter M, Protic M, et al. Surgical quality and nodal ultrastaging is associated with long-term disease-free survival in early colorectal cancer: an analysis of 2 international multicenter prospective trials. *Ann Surg*. 2010;252(3):467–74 (discussion 74–76).
40. Corral J, Borràs JM, Chiarello P, García-Alzorri E, Macià F, Reig A, et al. Estimación del coste hospitalario del cáncer colorrectal en Cataluña. *Gaceta Sanitaria*. 2015;29(6):437–44.
41. Weixler B, Warschkow R, Guller U, Zettl A, von Holzen U, Schmied BM, et al. Isolated tumor cells in stage I & II colon cancer patients are associated with significantly worse disease-free and overall survival. *BMC Cancer*. 2016;16:106.
42. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Botplus portalfarma. <https://botplusweb.portalfarma.com/>. Accessed 13 July 2017.
43. Instituto Nacional de Estadística (INE). <http://www.ine.es/>. Accessed 13 July 2017.
44. Oblikue Consulting S.L. Base de datos de costes sanitarios y ratios coste-efectividad españoles: eSalud. 2018. <http://www.oblikue.com/bddcostes/>. Accessed 3 Sept 2018.
45. MSSSI. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Gasto Sanitario. Informe Anual del Sistema Nacional de Salud. 2016. https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnualSNS2016/7Gast_Sanit.pdf. Accessed 3 Sept 2018.
46. Sirop S, Kanaan M, Korant A, Wiese D, Eilender D, Nagpal S, et al. Detection and prognostic impact of micrometastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2011;103(6):534–7.
47. Sloothaak D, Sahami S, van der Zaag-Loonen HV, Van der Zaag E, Tanis P, Bemelman W, et al. 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(3):263–9.
48. Iddings D, Ahmad A, Elashoff D, Bilchik A. The prognostic effect of micrometastases in previously staged lymph node negative (N0) colorectal carcinoma: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(11):1386–92.
49. Nicastrì DG, Doucette JT, Godfrey TE, Hughes SJ. Is occult lymph node disease in colorectal cancer patients clinically significant?: a review of the relevant literature. *J Mol Diagn*. 2007;9(5):563–71.
50. Schmoll H, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer: a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2479–516.
51. Van Cutsem E, Borràs JM, Castells A, Ciardiello F, Ducreux M, Haq A, et al. Improving outcomes in colorectal cancer: where do we go from here? *Eur J Cancer*. 2013;49(11):2476–85.
52. Sociedad Española de Oncología Médica. Información sobre el cáncer. Cáncer de colon y recto. <https://www.seom.org/es/info-sobre-el-cancer/colon-recto?start=8#content>. Accessed 13 July 2018.
53. Aldecoa I, Montironi C, Planell N, Pellise M, Fernandez-Esparach 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.
54. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós J, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(7):799–825.
55. Li Destri G, Di Carlo I, Scilletta R, Scilletta B, Puleo S. Colorectal cancer and lymph nodes: the obsession with the number 12. *World J Gastroenterol*. 2014;20(8):1951–60.
56. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buyse M, Andre T, et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol*. 2009;27(6):872–7.
57. MSSSI. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. La hospitalización en el Sistema Nacional de Salud CMBD—Registro de altas. Informe resumen 2010. Información y Estadísticas Sanitarias. 2012. https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/docs/Hospitalizacion_SNS_CMBD_Informe2010.pdf. Accessed 13 July 2017.
58. Sysmex Spain. 2018. <https://www.sysmex.es/>. Accessed 3 Sept 2018.
59. Andre T, Louvet C, Maindault-Goebel F, Couteau C, Mabro M, Lotz JP, et al. CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. *GERCOR*. *Eur J Cancer*. 1999;35(9):1343–7.
60. de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2938–47.
61. Jager E, Heike M, Bernhard H, Klein O, Bernhard G, Lautz D, et al. Weekly high-dose leucovorin versus low-dose leucovorin combined with fluorouracil in advanced colorectal cancer: results of a randomized multicenter trial. Study Group for Palliative Treatment of Metastatic Colorectal Cancer Study Protocol 1. *J Clin Oncol*. 1996;14(8):2274–9.
62. Maindault-Goebel F, de Gramont A, Louvet C, Andre T, Carola E, Gilles V, et al. Evaluation of oxaliplatin dose intensity in bimonthly leucovorin and 48-hour 5-fluorouracil continuous infusion regimens (FOLFOX) in pretreated metastatic colorectal cancer. *Oncology Multidisciplinary Research Group (GERCOR)*. *Ann Oncol*. 2000;11(11):1477–83.
63. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol*. 2001;19(21):4097–106.
64. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol*. 1993;11(10):1879–87.
65. Saltz LB, Douillard JY, Pirotta N, Alaki M, Gruia G, Awad L, et al. Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. *Oncologist*. 2001;6(1):81–91.
66. Emmanouilides C, Sfakiotaki G, Androulakis N, Kalbakis K, Christophylakis C, Kalykaki A, et al. Front-line bevacizumab in combination with oxaliplatin, leucovorin and 5-fluorouracil (FOLFOX) in patients with metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II study. *BMC Cancer*. 2007;7:91.
67. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of

- metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol*. 2007;25(30):4779–86.
68. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2014;371(17):1609–18.
 69. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, et al. Effect of first-line chemotherapy combined with cetuximab or bevacizumab on overall survival in patients with KRAS wild-type advanced or metastatic colorectal cancer: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2017;317(23):2392–401.
 70. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S-E, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1065–75.
 71. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4706–13.
 72. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4697–705.
 73. La hospitalización en el Sistema Nacional de Salud CMBD—Registro de altas. Informe resumen 2010. Información y estadísticas sanitarias 2012 [online database]. https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/docs/Hospitalizacion_SNS_CMBD_Informe2010.pdf. Accessed 8 Jan 2018.
 74. ICO. Institut Català d'Oncologia. Informe per a la comissió de farmàcia i terapèutica ICO i la sub-comissió de càncer de l'ICS. Cetuximab y bevacizumab. Càncer colorrectal metastàsico (CCRM) 1ª línea. 2016.
 75. ICO. Institut Català d'Oncologia. Informe per a la comissió de farmàcia i terapèutica ICO. Panitumumab vs cetuximab. Càncer colorrectal metastàsico (CCRM). 2010.

Affiliations

Sherley Diaz-Mercedes¹  · Ivan Archilla¹ · Jordi Camps^{2,8} · Antonio de Lacy³ · Iñigo Gorostiaga⁴ · Dulce Momblán³ · Ainitze Ibarzabal³ · Joan Maurel⁵ · Nuria Chic⁵ · Josep Antoni Bombí¹ · Francesc Balaguer^{2,8} · Antoni Castells^{2,8}  · Iban Aldecoa^{1,6}  · Josep Maria Borrás⁷ · Miriam Cuatrecasas^{1,4,8} 

¹ Pathology Department-Center of Biomedical Diagnosis (CDB), Hospital Clínic, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

² Gastroenterology Department, Hospital Clinic, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain

³ Surgical Department, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

⁴ Pathology Department, Araba University Hospital, Vitoria-Gasteiz, Spain

⁵ Medical Oncology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors Group, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁶ Neurological Tissue Bank of the Biobank Clinic-IDIBAPS-XBTC, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

⁷ Department of Clinical Sciences and Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁸ CIBERehd and Banc de Tumors-Biobanc Clinic-IDIBAPS-XBTC, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Estudio 2

Cytology smears: An enhanced alternative method for colorectal cancer pN stage. A multicentre study

Sherley Diaz-Mercedes ^{1,2,†}, Ivan Archilla ^{1,2,†}, Sara Lahoz ^{2,3}, Maria Teresa Rodrigo-Calvo ^{1,2}, Sandra Lopez-Prades ^{1,2}, Jordi Tarragona ⁴, Stefania Landolfi ⁵, Angel Concha ⁶, Isidro Machado ⁷, Joan Maurel ^{2,8,9}, Nuria Chic ⁸, Antoni Castells ^{2,3,9,10}, Francesc Balaguer ^{2,3,9,10}, Jordi Camps ^{2,3,9,11, *} and Miriam Cuatrecasas ^{1,2,9,10, *}

1. Department of Pathology, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

2. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

3. Gastroenterology Department, Hospital Clínic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

4. Pathology Department, Hospital Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain

5. Pathology Department, Vall de Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain

6. Department of Pathology, University Hospital A Coruña, 15006 A Coruña, Spain

7. Pathology Department, Instituto Valenciano de Oncología and Pathology Laboratory, Hospital Quiron Salud, 46009 Valencia, Spain

8. Oncology Department, Hospital Clínic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

9. Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

10. Basic Clinical Practice Department and Medicine Department, University of Barcelona (UB), 08036 Barcelona, Spain

11. Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, University Autonomous of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

* Correspondence: jcamp@recerca.clinic.cat (J.C.); mkuatrec@clinic.cat (M.C.); Tel.: +34-932275536 (M.C.)

† These authors contributed equally to this work.

Journal of Cancers 2022; 14 (24), 6072

Factor de impacto: 6,575

Oncology (Q1)

RESUMEN

Introducción: El carcinoma colorrectal (CCR) en estadio II sigue siendo un problema clínico, ya que aproximadamente el 15% de estos pacientes progresan a los 5 años del diagnóstico. Una de las razones es que algunos de estos pacientes son verdaderos estadios III en el momento del diagnóstico, debido a la presencia de metástasis en ganglios linfáticos (GL) no detectadas con el diagnóstico histopatológico convencional mediante HE.

Objetivos: El objetivo de este estudio multicéntrico, prospectivo y observacional fue evaluar la capacidad diagnóstica de realizar el estadio patológico ganglionar (pN) con extensiones citológicas de los GLs y compararlo con el estadiaje patológico pN estándar usando HE, así como con el análisis ganglionar con la técnica OSNA, obteniendo como resultado la carga tumoral total (TTL), definida como la suma de todas las copias de CK19 contenidas en todos los GLs de una resección quirúrgica de CCR.

Resultados: Se examinaron un total de 3.936 GLs de 217 CCR mediante tres métodos; 1: Método convencional mediante el análisis con HE, 2: Extensiones citológicas inmunoteñidas con CK19 y, 3: OSNA, que utiliza RT-LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle).

Con la HE se detectaron 29% casos de CCR con GLs positivos. Las improntas citológicas detectaron 35%, y mediante OSNA se detectaron 33,2% casos de CCR con positividad ganglionar ($P < 0,0001$). La HE y las improntas citológicas clasificaron concordantemente el 92,2% de los estadios ganglionares y el 88,5% entre OSNA y HE. La citología tuvo una sensibilidad del 96,8% y una especificidad del 90,3% para discriminar pacientes positivos/negativos en comparación con HE ($P = 0,004$), con una sensibilidad del 87,3% y una especificidad del 89% en comparación con OSNA ($P = 0,56$). Los pacientes con

GLs positivos detectados por cualquiera de los tres métodos tuvieron supervivencias global y libre de enfermedad significativamente peores.

Conclusiones: Demostramos que es factible la utilización de extensiones citológicas para el diagnóstico del estadiaje patológico ganglionar (pN). Además, las extensiones citológicas son superiores a la HE para la detección celularidad tumoral en GLs. El análisis de los GLs con OSNA resulta en una mejor estadificación de los pacientes con CCR y es un factor pronóstico al correlacionarse cargas tumorales >6000 copias/ μ L con peores supervivencias global y libre de enfermedad, lo que contribuya al manejo terapéutico de los pacientes. El estadio pN obtenido con extensiones citológicas permitirá poder utilizar todo el GL para estudio molecular con OSNA.

Article

Cytology Smears: An Enhanced Alternative Method for Colorectal Cancer pN Stage—A Multicentre Study

Sherley Diaz-Mercedes ^{1,2,†} , Ivan Archilla ^{1,2,†} , Sara Lahoz ^{2,3}, Maria Teresa Rodrigo-Calvo ^{1,2}, Sandra Lopez-Prades ^{1,2}, Jordi Tarragona ⁴ , Stefania Landolfi ⁵, Angel Concha ⁶, Isidro Machado ^{7,8}, Joan Maurel ^{2,9,10} , Nuria Chic ⁹, Antoni Castells ^{2,3,10,11,12}, Francesc Balaguer ^{2,3,10,11,12} , Jordi Camps ^{2,3,10,13,*} and Miriam Cuatrecasas ^{1,2,10,11,12,*} 

¹ Department of Pathology, Hospital Clinic of Barcelona, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

² Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

³ Gastroenterology Department, Hospital Clinic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

⁴ Pathology Department, Hospital Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain

⁵ Pathology Department, Vall de Hebron University Hospital, 08035 Barcelona, Spain

⁶ Department of Pathology, University Hospital A Coruña, 15006 A Coruña, Spain

⁷ Pathology Department, Instituto Valenciano de Oncología, 46009 Valencia, Spain

⁸ Pathology Laboratory, Hospital Quiron Salud, 46009 Valencia, Spain

⁹ Oncology Department, Hospital Clinic of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

¹⁰ Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

¹¹ Basic Clinical Practice Departament, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

¹² Medicine Department, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain

¹³ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, University Autonomous of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

* Correspondence: jcamps@recerca.clinic.cat (J.C.); mcuatrec@clinic.cat (M.C.); Tel.: +34-932275536 (M.C.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: 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. <https://doi.org/10.3390/cancers14246072>

Academic Editor: David Wong

Received: 1 November 2022

Accepted: 5 December 2022

Published: 9 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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: Recurrence of stage II (pT3–T4 pN0) colorectal cancer (CRC) occurs in about 15% of patients and it is often due to undetected lymph node (LN) metastases with conventional pathology haematoxylin and eosin (H&E) LN analysis. Despite more sensitive molecular methods of LN staging having proved to have prognostic value in stage II CRC, we aimed at determining whether the pN stage could be better assessed with LN cytology smears. We analysed 3936 LNs from 217 CRC surgical resections, using three methods, H&E, cytology smears, and the One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) molecular assay. We compared the pN stages obtained from both H&E and cytology, as well as with the OSNA results. We concluded that LN analysis with cytology smears not only enables performing the pN stage, but detects more LN metastases than H&E, with a similar detection rate to molecular methods. Cytology LN analysis would allow a better patient therapeutic management.

Abstract: Stage II colorectal cancer (CRC) recurrence remains a clinical problem. Some of these patients are true stage III CRC with a pN0 pathology stage. This large prospective multicentre cohort study aimed at evaluating the diagnostic ability of lymph node (LN) cytology smears to perform the pN stage and compare it with the conventional haematoxylin and eosin (H&E) pathology pN stage. Additionally, we used the One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA), a high-sensitive molecular method of LN staging. A total of 3936 fresh LNs from 217 CRC surgical specimens were examined by three methods, H&E, LN cytology smears, and OSNA. H&E detected 29% of patients with positive LNs, cytology smears 35%, and OSNA 33.2% ($p < 0.0001$). H&E and cytology concordantly classified 92.2% of tumours, and 88.5% between OSNA and H&E. Cytology had 96.8% sensitivity and 90.3% specificity to discriminate positive/negative patients compared to H&E ($p = 0.004$), and 87.3% sensitivity and 89% specificity when compared to OSNA ($p = 0.56$). Patients with positive LNs detected by any of the three methods had significantly worse disease-free and overall survival. We conclude that pN stage accuracy for detecting positive LNs is superior with LN cytological smears

than with conventional H&E, which would enable a better pN stage and management of early-stage CRC patients.

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

1. Introduction

The presence of lymph node (LN) metastases greatly influences colorectal cancer (CRC) patients' survival at any T stage of the disease, as it determines the need for adjuvant chemotherapy [1–3]. According to current CRC diagnostic protocols, the LN stage (pN) is based on the number of positive formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) LNs detected on routine haematoxylin and eosin (H&E) stains [2]. Yet, the landscape of CRC has recently changed with the introduction of population-based screening programs, which encompass an increased diagnosis of patients at earlier stages of the disease. In this new scenery, stages I–II (T1–T4 N0) CRC represent 70% of all CRC diagnoses [4–8]. Furthermore, in the early stages of CRC, LN metastases are often small sized, thus, H&E LN analysis could oversight the presence of micrometastases, since only a small part of the LN is examined [9]. In fact, the main reason for the low sensitivity of H&E pN staging is tissue allocation bias. Still, this deficiency is well known. Therefore, pathology diagnosis guidelines require the analysis of a minimum of 12 LNs for a reliable pN0 stage [10,11].

On the one hand, in the new arena of CRC screening, there is an unmet clinical need to incorporate more sensitive, reliable, and efficient diagnostic methods for a more accurate pN stage, especially for stage II CRC, which would allow better clinical management of these patients [9,12]. On the other hand, the use of molecular methods of LN analysis allows for the identification of patients at risk of progression, not detected by conventional H&E [9,13,14]. In fact, it is well established that molecular detection of micrometastases, in otherwise H&E negative LNs from CRC surgical specimens, has been associated with worse prognosis [9,12,15]. The One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) molecular assay is a quantitative, fast, and reproducible RT-PCR-based method for the detection of cytokeratin 19 (CK19) mRNA. It has been validated for the analysis of sentinel LNs in breast carcinoma and for CRC pN stage [12,16–24]. Its results are expressed as the total tumour load (TTL), defined as the amount of CK19 mRNA copies/μL present within all the LNs analysed from a surgical specimen [17,21]. In breast carcinoma, molecular LN assessment gives information on the amount of tumour burden present in the LN compartment, which has predictive and prognostic values [16–21]. In CRC, the TTL has prognostic value [12,15].

Diagnostic cytology is the science of diagnosis of disease through the analysis of cells. It was introduced in 1928 by George N Papanicolaou as a tool to detect cancer and precursor lesions. It has been widely used in cervical and anal cancer screening programs, which have achieved a great reduction in its incidence in many countries [25,26]. This simple morphology-based diagnostic method is routinely used in clinical practice for the diagnosis, decision-making, and treatment of benign and malignant conditions, either alone or complementary to standard surgical pathology diagnosis [27–29]. Diagnostic cytology has many advantages, such as being a simpler and less-invasive procedure than biopsy or surgical resection. It is also inexpensive and has a fast turnaround time for diagnosis reporting.

In this large prospective multicentre cohort study on CRC, we aimed to evaluate the diagnostic ability of cytology-based LN analysis to perform the pN stage and compare it to the standard H&E pN stage, as well as to the high-sensitive OSNA molecular method. We demonstrated the capability of performing the pN stage with cytology smears, and its superiority to detect positive LNs compared to conventional H&E, with a similar detection rate to molecular methods. The use of cytology smears would enable to obtain a more accurate pN stage in CRC, enabling a better patient therapeutic management, and at the same time the use of the whole LN tissue for molecular analysis.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Inclusion Criteria

This is a large observational and prospective multicentre cohort study conducted from November 2016 to December 2019 at five tertiary university hospitals. The study was approved by the ethic and scientific committees of all centres (Reg. 2012/7324) and all patients signed the informed consent to participate in the study. All CRC patients undergoing curative-intended surgery were considered for the study. Inclusion criteria were patients over 18 years-old, with primary histologically confirmed CRC, positive for cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry (IHC). Exclusion criteria were patients with non-invasive tumours, synchronous carcinomas, metastatic carcinomas, presence of neoadjuvant or adjuvant therapy, familial adenomatous polyposis syndrome, carcinomas on inflammatory bowel disease, stent-type intraluminal devices or presence of other malignancies.

2.2. Fresh Lymph Node Dissection and LN Analysis

Surgical specimens from CRC were received at the pathology department immediately after surgical excision and fresh LN dissection was performed within 45 min of surgical extraction. Freshly dissected LNs were bi-sectioned. One-half of the LN was used to perform cytology smears by making a circular movement on the surface of a pre-treated slide. Then, that half of the LN was submitted for conventional FFPE tissue processing. The other half of the LN was placed into a microcentrifuge tube for deferred OSNA analysis, which was performed using the pooling method, as described in Rakislova et al. [30] (Figure 1a,b). The same procedure was performed with each LN. Each slide contained smears from six LNs. Slides were air-dried and CK19-IHC staining was performed either on the same day or stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further immunostaining on subsequent days. After the IHC staining was performed on the cytology smears, the slides were ready for microscopic assessment and cytology pN staging (Figure 1c). After LN dissection, the surgical specimen was routinely processed following overnight formalin fixation. In some cases, a few additional LNs were observed on H&E slides, located in the fat by the colorectal wall. These FFPE LNs were only considered for the H&E pN stage since fresh analysis by cytology or OSNA was not performed.

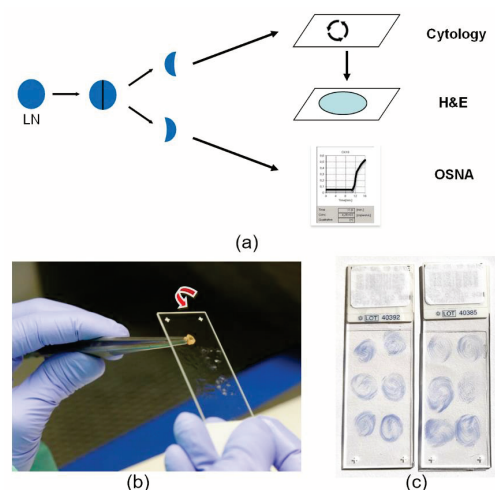


Figure 1. Fresh lymph node analysis with three methods, cytology smears, H&E, and OSNA. (a) Dissected lymph nodes were bisected. A cytology smear was performed on a pre-treated slide, and that part of the lymph node was then used for FFPE and histology analysis with H&E. The other half of the LN was used for the molecular OSNA assay. (b) For each LN, cytology smears were performed by making a circular movement with gentle pressure on the pre-treated slide to ensure a smooth monolayer of cells. (c) Slides containing six lymph node smears were air-dried and immunostained with CK19 antibody, using haematoxylin as counterstain.

2.3. One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Assay

The OSNA assay is a simple, standardized, and fast process for LN analysis. It is an automated molecular method based on the quantification of the amount of cytokeratin 19 mRNA, performed with the RD-100i system (Sysmex, Kobe, Japan). It uses the RT-LAMP, an RT LOOP-mediated isothermal amplification at 65 °C. In contrast to RT-PCR, there is no need for mRNA extraction or purification. LN tissue is homogenized in a specific lysis buffer and centrifugated, then, the lysate supernatant is used for amplification. Quantification is performed by the detection of precipitated results in turbidity of the magnesium pyrophosphate, a by-product of the amplification process. The system is run with adequate controls, i.e., b-actin mRNA to check mRNA quality, a positive control with a given number of copies of CK19 mRNA, and a negative control without CK19 mRNA, which are used for calibration and contamination check. Cross-amplification with the two CK19 pseudogene products is prevented by using six primers, including the forward and reverse loop primers, thus, avoiding simultaneous genomic DNA amplification [31,32].

The molecular LN assessment with the OSNA assay was performed according to the manufacturer's instructions using the pooling method, in which each PCR tube contained multiple LNs from the mesocolon or mesorectum, as described in Rakislova et al. [30]. The OSNA results were obtained in 20 to 40 min and were expressed as the total tumour load (TTL), defined as the tumour burden contained in all LNs analysed from a given case. The TTL was considered positive when values were ≥ 250 copies/ μ L [32,33].

2.4. CK19 Immunocytochemistry

The slides containing LN smears were immersed in absolute alcohol for 10 min and a standard immunocytochemistry protocol was performed, without the need for antigen retrieval. CK19 immunostains were performed using the Autostainer Link 48 (Agilent, Santa Clara, CA, United States), with 20 min incubation with the primary CK19 antibody (CK19 mouse monoclonal, clone RCK108; IR615 pre-diluted. Agilent, Santa Clara, CA, United States). In cytology smears, membranous staining with or without cytoplasm staining of tumour epithelial cells, either solitary or in groups, was considered positive (Figure 2a,b). Immunohistochemistry was also performed on all primary tumours. This was performed to ensure that all tumours were positive for CK19. Then, a negative OSNA LN analysis could be considered a real negative, and not due to the negativity of the primary tumour for CK19. The standard CK19 IHC protocol was used as described in Aldecoa et al. [14]. Staining of at least 10% of the primary tumour was considered positive (Figure 2c).

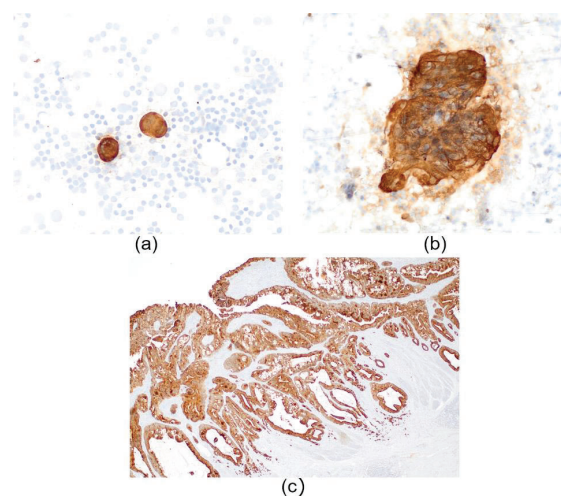


Figure 2. CK19 immunocytochemistry. (a) Positive CK19 immunocytochemistry stains of cytology smears from different lymph nodes showing few solitary tumour cells. (b) A group of positive tumour cells from a cytology smear. (c) A primary colorectal carcinoma positive for CK19 immunohistochemistry.

2.5. Lymph Node Pathology Reporting and pN Staging

All freshly dissected LNs were analysed by three methods: (1) H&E; (2) LN cytology smears immunostained with CK19; and (3) the OSNA assay (Figure 1a) by four gastrointestinal pathologists (SDM, IA, MTR, and MC). The pN stage of the pathology report resulted from the standard H&E histological diagnosis, performed according to the pTNM classification of the AJCC, 8th Edition [10]. The pN stage evaluation from cytology smears was as follows; each slide contained smears from six LNs. Each smear was individually analysed. Any CK19 IHQ-positive epithelial cells, either individually or in groups, were considered positive. Then, the final number of positive smears corresponded to the number of positive LNs, which was converted into the pN cytology stage. Any information obtained from the pN stage from cytology smears or the TTL from the OSNA assay was not included in the final pathology report and was blind to the pathologist and clinician, as they were assessed after the regular pathology report was issued.

2.6. Statistical Analysis

All analyses were carried out using R statistical language version 3.6. Numerical variables were tested for their normal distribution using Shapiro-Wilk's statistics. To test the association of numerical variables between groups, Student's *t*-test was applied for parametric data and the Mann-Whitney-Wilcoxon U test for non-parametric. Fisher's exact test was utilized to calculate *p*-values in the case of categorical classes. Correlation scores regarding the number of positive LNs between methods were calculated using Spearman's rank test. Correlation scores regarding nominal pN stages (pN0, pN1, pN2) were evaluated with Cohen's kappa statistics in the *fmsb* package. Classification performance of cytological smears to discriminate LN-positive patients in comparison to H&E and OSNA was calculated using *caret* package in terms of sensitivity and positive predictive value (PPV), and to discriminate LN-negative cases in terms of specificity and negative predictive value (NPV). McNemar's chi-squared test was utilized to assess the symmetry of paired nominal data in a two-dimensional contingency table.

2.7. Study Endpoints and Survival Analysis

The positive detection rate (PDR) of each method of LN analysis was considered the study's primary endpoint. PDR was defined as the proportion of patients with positive LNs. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were assessed as secondary study endpoints. DFS was defined as the time from surgical intervention to relapse or death, whichever occurred first. OS was the time from surgical intervention to patient death. Data for patients who experienced no event were censored at the time of the last follow-up. The Kaplan–Meier method in the survival R package was applied to estimate time-to-event values, and a log-rank test was used to test statistical significance in DFS and OS between patient arms. Hazard ratios (HR) and their associated 95% confidence intervals (CI) were inferred with the use of a Cox regression model with proportional hazards in a univariate and multivariable manner. Variables used for adjusting multivariable models were patient age, sex, pT stage, and histological grade.

3. Results

3.1. Clinical and Pathological Characteristics

A total of 217 CRC patients were prospectively included in this observational multi-centre cohort study. Clinical and pathological characteristics of the patients and tumours are shown in Table 1. Patients' median age at surgery was 71 years-old (range 39–92) and 59.4% were male. Most tumours (71%) were stage I–II. A median of 18 LNs were dissected per patient (range 4–62), being 17 of them freshly isolated. A total of 4310 LNs from 217 CRC surgical specimens were isolated, of which 3936 (91.3%) were freshly acquired. Post-formalin-fixation LNs were observed in the fat tissue adjacent to the colorectal wall.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of the study cohort.

Variable	Strata	Patients (N = 217)	
		n %	
Age	Median, years (range)	71 (39–92)	
Sex	Male	129	59.4%
	Female	88	40.6%
Histological grade	High	87	40.1%
	Low	130	59.9%
pT stage	T1	42	19.4%
	T2	61	28.1%
	T3	97	44.7%
	T4	17	7.8%
pN stage by H&E	N0	154	71%
	N1	46	21.2%
	N2	17	7.8%
pN stage by cytology	N0	141	65%
	N1	55	25.3%
	N2	21	9.7%
Total tumor load (CK19 mRNA copies/uL)	Median (range)	19,225.16 (0–1,600,000)	
	<250	145	66.8%
	250 to 6000	15	6.9%
	>6000	57	26.3%
Number of Lymph Nodes (Total: 4310)	Fresh LN	3936	91.32%
	Post-formalin fixation LN	374	8.68%
Lymph nodes (LNs) analysed per patient	Total (median, range)	18 (4–62)	
	Fresh (median, range)	17 (3–62)	
	Post-fixation formol (median, range)	0 (0–27)	
Recurrence	Yes	33	15.2%
	No	184	84.8%
Adjuvant chemotherapy	Yes	55	25.5%
	No	161	74.5%
Lymphovascular invasion	Yes	73	66.4%
	No	144	33.6%
Perineural invasion	Yes	45	20.7%
	No	172	79.3%
Tumour budding	Bd1	120	55.3%
	Bd2	53	24.4%
	Bd3	44	20.3%

3.2. Patient Positive Detection Rate Is Higher with Cytology Smears and OSNA Than with H&E

The average positive detection rate (PDR) by the three methods was 70 patients (32.3%; 95% CI, 26–38.5%). The PDR achieved with H&E was 63 patients (29%; 95% CI, 23–35%), compared to a PDR of 76 patients detected with the cytology-based analysis (35%; 95% CI, 28.7–41.4%), ($p < 0.0001$ compared to H&E). Regarding the OSNA assay, its PDR was of 72 patients (33.2%; 95% CI, 26.9–39.4%) ($p < 0.0001$ compared to H&E), (Figure 3; Table 2).

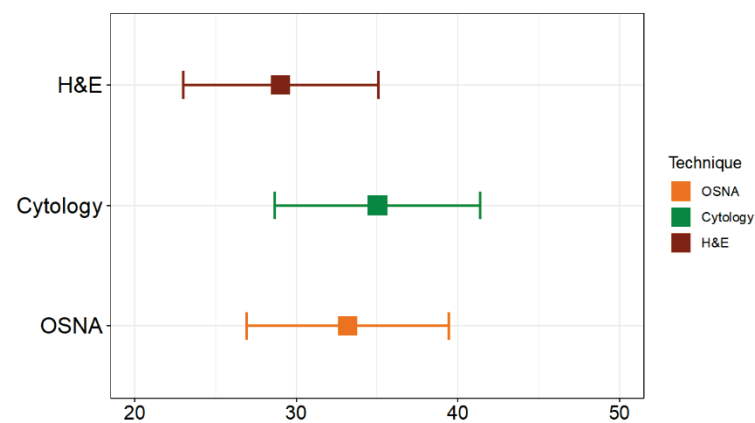


Figure 3. Forest plot displaying the positive detection rate, or proportion of patients with positive lymph nodes, of the three methods of LN analysis. H&E: haematoxylin and eosin; OSNA: one-step nucleic acid amplification.

Table 2. Comparison of the number of positive LN detected by the three methods.

		H&E	Cytology	OSNA
Proportion of Patients/Detection Rate	Number (%)	217 (100%)	217 (100%)	217 (100%)
	Positive LNs	63 (29%)	76 (35%)	72 (33.2%)
	Negative LNs	154 (71%)	141 (65%)	145 (66.8%)
Total number of LNs analysed	Number (%)	3936 (100%)	3936 (100%)	3926 (100%)
	Positive	210 (5.3%)	249 (6.3%)	-
	Negative	3726 (94.7%)	3687 (93.7%)	-
Average number of LNs analysed per patient	Mean (range)	18.1 (3–62)	18.1 (3–62)	-
	Positive	0.97 (0–17)	1.15 (0–17)	-
	Negative	17.2 (1–62)	17 (3–62)	-

H&E, haematoxylin, and eosin; LNs, Lymph nodes.

When focusing on the number of positive LNs detected by H&E and by cytology smears, we observed that cytology detected a higher number of positive LNs than H&E. With the standard H&E pathology examination we found 210/3936 (5.3%) positive LNs, while cytology smears detected 249/3936 (6.3%) positive LNs (Fisher's $p = 0.067$) (Table 2). The Spearman's correlation score for the number of positive LNs between H&E and cytology smears was 85.5% ($p < 0.0001$). The mean number of positive LNs per patient detected by H&E was 0.97 (range, 0–17) and by cytology 1.15 (range, 0–17).

3.3. pN Upstaging with LN Cytology Smears with Respect to H&E and High Diagnostic Efficacy of Cytology Smears to Discriminate LN-Positive Patients

We next sought to compare the pN stages obtained from conventional H&E LN analysis and cytological smears. H&E classified 154 (71%) pN0 patients, 46 (21.2%) pN1, and 17 (7.8%) pN2. In contrast, LN smears identified 141 (65%) pN0 patients, 55 (25.3%) pN1, and 21 (9.7%) pN2. Cytology upstaging was 6%, with 4.1% of patients reclassified as pN1 and 1.9% as pN2 (Table 3).

Table 3. Concordance in the pN staging among techniques and diagnostic accuracy.

pN Staging by H&E			pN Staging by Cytology			OSNA		
pN0	pN1a+b	pN2a+b	pN0	pN1a+b	pN2a+b	0 to <250	250 to <6000	≥6000
154 (71%)	46 (21.2%)	17 (7.8%)	141 (65%)	55 (25.3%)	21 (9.7%)	145 (66.8%)	57 (26.3%)	15 (6.9%)
Negative	Positive		Negative	Positive		Negative (<250)	Positive (≥250)	
154 (71%)	63 (29%)		141 (65%)	76 (35%)		145 (66.8%)	72 (33.2%)	
Concordant cases, number (%)			200 (92.2%)			192 (88.5%)		
Discordant cases, number (%)			17 (7.8%)			25 (11.5%)		
Kappa Index			82.1%			73.2%		
McNemar's <i>p</i> -value			0.004			0.11		
Sensitivity (%)			96.8%			87.3%		
Specificity (%)			90.3%			89%		
Positive Predictive Value (%)			80.3%			76.4%		
Negative Predictive Value (%)			98.6%			94.5%		
Number of cases			Cytology-negative	Cytology-positive		OSNA-negative	OSNA-positive	
H&E-negative			139	15		137	17	
H&E-positive			2	61		8	55	

H&E, hematoxylin and eosin; LNs, Lymph nodes.

We subsequently assessed the diagnostic efficacy of cytology smears and OSNA-based analysis to identify LN-positive patients as compared with gold-standard H&E. Examination of 3936 LNs from 217 patients revealed that 200 tumours (92.2%) were concordantly classified by cytology-based analysis and routine H&E stains, ($\kappa = 0.82$, $p < 0.004$), (92.2% accuracy; 95% CI: 87.8–95.4%) (Table 3). In detail, out of 63 (29%), LN-positive patients detected with H&E, only two of them were classified as LN-negative by cytology, resulting in 96.8% sensitivity for cytology to distinguish pN-positive cases. In parallel, the positive predictive value (PPV) of cytology was 80.3%, indicating that among the 76 positive patients detected by cytology, 61 of them (80.3%) were positive according to H&E. On the other hand, out of a total of 154 cases (71%) detected as LN-negative by conventional H&E, 15 of them were positive by cytology, leading to 90.3% specificity to differentiate pN-negative individuals (Table 3).

When assessing OSNA versus H&E results, the two methods exhibited a global concordance rate of 192/217 cases (88.5% accuracy; 95% CI: 86.5–90.4%) (Table 3). Specifically, the sensitivity achieved by OSNA to detect LN-positive cases was 87.3%, since 8/63 patients positive with H&E were negative for OSNA, resulting in a PPV of 76.4%. Regarding the identification of LN-negative cases, OSNA was 89% specific, with 17/154 positive cases which were negative with H&E (Table 3).

Assessment of cytology versus OSNA results resulted that the two methods exhibited a global concordance rate of 191/217 cases (88% accuracy; 95% CI: 86.06–89.98%). Specifically, out of the 76 individuals determined as LN-positive by cytology, 61 of them (80.3%) were also positive according to OSNA-based analysis, with 80.3% sensitivity and 84.7% PPV for the detection of LN-positive cases. As regards to the identification of LN-negative cases, cytological smears detected 141 cases as negative (65%) while OSNA identified 145 (66.8%) negative cases, with a specificity of 92.2% and NPV of 89.7%.

When comparing the three methods of LN analysis, 183/217 were concordantly classified accounting for LN-positive and LN-negative cases (84.3% accuracy). Out of these, 55/217 (25.3%) were categorized as positive, and 128/217 (59%) as negative by the three techniques. All patients with positive LNs obtained post-formalin fixation also had other freshly processed positive LNs identified by either H&E or LN smears ($n = 16/217$ patients (7.4%); representing 72/374 (18.9%) positive LNs).

3.4. The Total Tumour Load (TTL) Increases with the pN Stage

We then compared the total tumour load (TTL) with the pN stages obtained by H&E and cytology-based LN analyses. In both assessments, the TTL significantly increased in accordance with the pN stage obtained by H&E (Figure 4a) and cytology (Figure 4b) (ANOVA's $p < 0.0001$ in both analyses). The mean TTL values for the respective pN stages obtained by H&E were: 433.6 copies/ μ L for pN0 (range 0–27,300 copies/ μ L); 35,782.6 copies/ μ L for pN1 (range 0–488,000 copies/ μ L), and 144,651.8 copies/ μ L for pN2 cases (range 0–1,600,000 copies/ μ L). Similarly, the mean TTL values for the pN stages obtained by cytology were 253.7 copies/ μ L for pN0 (range 0–20,000 copies/ μ L); 29,899 copies/ μ L for pN1 (range 0–488,000 copies/ μ L), and 118,649.5 copies/ μ L for pN2 stage (range 0–1,600,000 copies/ μ L).

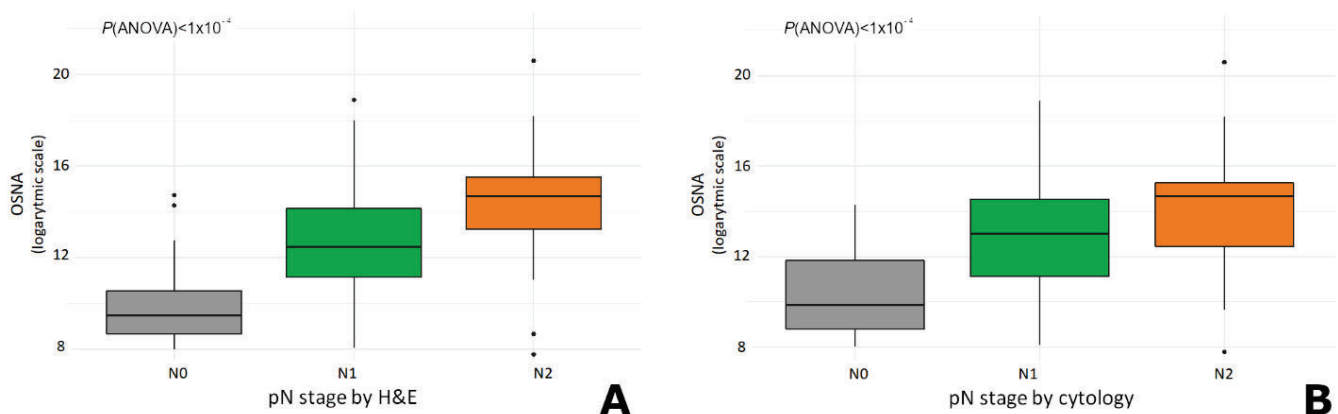


Figure 4. Total tumour load (TTL) values obtained by OSNA were correlative to the pN stages determined by (A) H&E and (B) cytology-based analysis. p -values were determined using an ANOVA test. Tumours with OSNA > 300,000 (superior outlier values) were excluded from both graphs to enable a better visualization between groups. H&E: haematoxylin and eosin; OSNA: one-step nucleic acid amplification.

3.5. Patients with Positive LNs Exhibit Worse Survival Outcome as Determined by Any of the Three Methods

Follow-up data were available for 207 patients (95.4%), with a median follow-up of 33 months (range, <1 to 58.2 months). Thirty-three patients (15.2%) had a local recurrence or distant metastases, of whom 21/33 (63.6%) received adjuvant chemotherapy for having positive LNs on H&E. The median time to relapse was 11.4 months (rate, <1 to 39.5 months), and to death was 22.7 months/range, <1 to 47.8 months).

We next evaluated the independent prognostic value of having positive LNs analysed by the three methods separately. LN positivity correlated with worse RFS and OS rates for the three methods of LN detection, both at the univariate and multivariable settings (Figure 5; Table 4). Patients with positive LNs detected by cytology smears exhibited significantly shorter RFS and OS, and therefore higher risk of relapse and/or death compared with LN-negative patients (HR: 4.50, $p < 0.0001$ for DFS; and HR: 2.54, $p = 0.008$ for OS). The association with adverse patient survival was also significant for patients with positive LNs when detected by H&E (HR: 4.85, $p < 0.0001$ for DFS; and HR 2.70, $p = 0.004$ for OS). When assessed by OSNA, patients with positive LNs were at a significantly superior risk of cancer recurrence and/or death using a TTL threshold of 250 copies/ μ L (HR: 3.80, $p < 0.0001$ for RFS; HR 2.51, $p = 0.02$ for OS) (Table 4). As expected in early-stage and locally advanced CRC, the relationship with unfavourable survival outcomes was statistically more pronounced for RFS than for OS (Figure 5; Table 4).

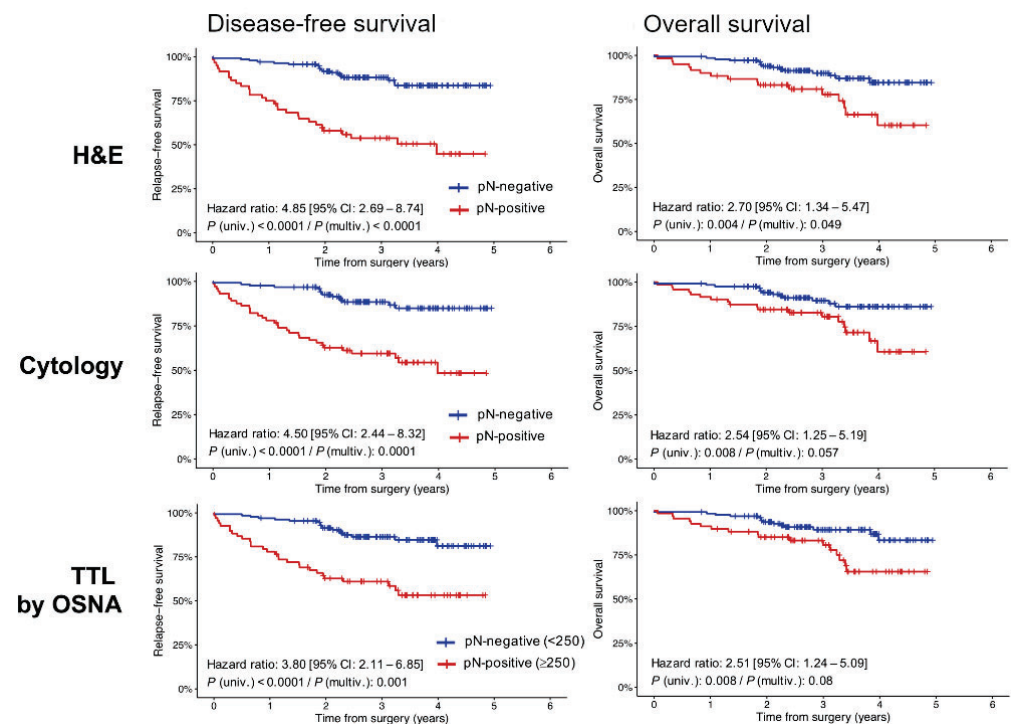


Figure 5. Kaplan-Meier estimates displaying RFS and OS rates according to pN-positive/negative patients by the three methods of LN analysis. p -values were calculated using a log-rank test and hazard ratios (HRs) by Cox proportional hazards models both in univariate and multivariable settings. Multivariable models were adjusted by age, sex, pT stage, and histological grade. H&E, haematoxylin, and eosin; TTL, total tumour load; OSNA, one-step nucleic acid amplification; univ., univariate; multiv., multivariable.

Table 4. Patient’s survival related to lymph node status.

Variable	Strata	Disease-Free Survival (RFS)				Overall Survival (OS)			
		Univariate Analysis		Multivariable Analysis		Univariate Analysis		Multivariable Analysis	
		HR (95% CI)	p -Value	HR (95% CI)	p -Value	HR (95% CI)	p -Value	HR (95% CI)	p -Value
pN stage H&E	N1/N2 vs. N0	4.85 (2.69–8.74)	<0.0001	4.27 (2.14–8.49)	<0.0001	2.70 (1.34–5.47)	0.004	2.25 (1–5.08)	0.049
pN stage cytology	N1/N2 vs. N0	4.50 (2.44–8.32)	<0.0001	3.87 (1.95–7.69)	0.0001	2.54 (1.25–5.19)	0.008	2.20 (0.98–4.94)	0.057
TTL	Positive vs. Negative	3.80 (2.11–6.85)	<0.0001	2.90 (1.53–5.50)	0.001	2.51 (1.24–5.09)	0.02	1.97 (0.91–4.26)	0.08

H&E, hematoxylin and eosin; TTL, total tumour load.

4. Discussion

In this large multicentre cohort study, we demonstrated the feasibility of using LN cytology smears for pN assessment in CRC. Moreover, cytology smears were superior in the detection of the presence of tumour cells within the LNs than conventional H&E pathology, with a similar performance to the OSNA molecular assay. We observed that both the number of positive LNs and the positive detection rate, or the proportion of positive patients, were significantly superior when the LN analysis was performed by cytology or OSNA than by H&E ($p < 0.0001$). The high sensitivity of the cytology compared to H&E could be explained by the smooth pressure applied on the LN when performing the circular

smear on the slide, which may contribute to squeezing out the epithelial cells from deeper areas of the LN, thus, the cells represented on the smear are not just those from the cut surface.

The concordance between the three methods of LN analysis to classify LN-positive and negative cases was 84.3%. Regarding cytology and H&E, it was very high, with 92.2% of cases (200/217) concordantly classified by both methods of LN analysis. Indeed, the positive predictive value of cytology smears for identifying LN positive cases was 80.3%, and its negative predictive value to differentiate LN negative cases was 98.6% with respect to H&E. In the current study we had 15.7% (34/217) discordant cases between the three methodologies, of which 2.7% (6/217) were patients with positive LNs by OSNA and/or cytology, not detected by H&E. Discordant results were mostly attributed to tumour allocation bias, due that different parts of the LN were used for the different methodologies.

According to current international guidelines, H&E is the gold standard method of LN assessment and pN stage in CRC. In the pre-screening era of CRC, this method of LN stage has had a good correlation with patient's recurrence and survival, but it has been demonstrated to be insufficient for the detection of LN micrometastases, which are frequent in early stages of the disease [9]. In fact, stage II CRC patients are still difficult to manage, and 10–15% may recur within 5 years of curative-intended surgery [34]. The latter is attributable to the fact that only a small part of the LN is examined by H&E, which is the reason for requiring the analysis of a minimum of 12 LNs to ensure a reliable pN0 stage [2]. In the setting of pN0 CRC, the presence of LN micrometastases detected by other methods is known to be related to worse survival rates. Several alternative methods of LN assessment have proved to be more sensitive than conventional H&E, allowing for the detection of occult metastases in CRC LNs [9]. Among them, some authors have included both half parts of the LNs in the paraffin block, performing serial H&E sections, or alternating consecutive H&E sections and cytokeratin IHC stains, as it is conducted with sentinel LNs. Other studies have considered the OSNA molecular assay to detect LN metastases with good results [14,24,33,35,36]. In CRC, the OSNA assay has demonstrated its significant superiority to conventional H&E pathology analysis to detect LN metastasis, with an LN upstaging ranging from 10 to 50% [12,15,24,33,36–39]. In one recent review of 16 studies with OSNA in CRC, the overall diagnostic performance had a specificity of 96.8%, with a concordance rate of 96.0%, and a negative predictive value of 98.6%, confirming the utility of this method of LN analysis [40]. Nevertheless, all the studies performed up to date regarding the analysis of CRC LNs with OSNA, have used one part of the LN for OSNA analysis and the other part for pN staging by means of FFPE and H&E diagnosis [14,22,33]. In consequence, it cannot be disregarded that the current OSNA results published so far, may have an inherent tumour allocation bias of the metastases, and thus, also a bias in the real amount of tumour present in the LNs of CRC. Despite this methodological-related bias, the results obtained with OSNA LN staging in CRC have been encouraging, being better than those obtained with H&E. In this regard, Rakislova et al. first observed that patients with TTL > 7000 copies/ μ L of CK19 mRNA had an increased recurrence hazard ratio of 4.3. More recently, a study by Itabashi found that OSNA positivity was related to recurrence in stage II CRC patients, with significantly lower 3-year DFS rates ($p = 0.027$). Archilla et al. validated the latter results and observed that a TTL $\geq$ 6000 copies/ μ L was related to prognosis with poorer DFS and OS. Thus, TTL has proved to be a prognostic factor related to DFS and OS in CRC [12,15,30]. In addition, the amount of tumour within the LNs, or TTL, is related to the conventional pN stage. Yamamoto observed a progressive increase of the TTL from pN0 to pN2, with 1550 copies/ μ L for pN0, 24,050 copies/ μ L for pN1, and 90,600 copies/ μ L for pN2 patients [24]. These results were endorsed by Archilla et al. with similar TTL values, i.e., 1775 copies/ μ L in pN0, 49,413 copies/ μ L in pN1, and 95,000 copies/ μ L in pN2 cases [15]. In the present study, we also observed that the TTL significantly increased as it increased the pN stage obtained by both cytology and H&E, being under 500 copies/ μ L for pN0, under 50,000 copies/ μ L for pN1, and between 110,000 and 144,000 copies/ μ L for pN2.

In this study, we observed that LN positivity obtained by any of the three methods of LN analysis was related to worse DFS and OS. Thus, it is advisable to use methods with a high positive detection rate to be able to identify all possible patients with worse outcomes. In addition, there is still an unmet need for a more accurate assessment of LNs in CRC [9]. Importantly, in breast carcinoma, LN analysis with OSNA is performed by using the entire LN tissue, having the TTL both predictive and prognostic values [21,41,42]. LN cytology analysis would not only allow giving an accurate pN stage of CRC patients, but also would enable to use of the whole LN tissue for OSNA analysis, as it is performed in breast carcinoma, and provide complete information of the real tumour burden present within the LN compartment of CRC patients. An alternative new approach to H&E LN analysis should be considered in CRC for an enhanced detection of LN metastases, which would enable direct therapeutic decisions and better patient management [12,15].

We performed this large multicentre cohort study to go one stage forward in the CRC LN stage. It represents an intermediate step to using the whole LN for the OSNA assay as it is performed in breast carcinoma. To reach this goal, we analysed CRC LNs by three methods, cytology smears, H&E and OSNA, and compared the pN stage obtained with cytology with the conventional pN stage resulting from H&E, as well as with the OSNA TTL values. We have demonstrated with good results the use of cytology smears as an improved alternative method of the pN stage. Cytology pN stage could be used instead of the conventional pN H&E stage to guide the oncologist in early stages of CRC, as an intermediate step before the use of LN molecular analysis. The next step should be to perform a large study in which the pN stage would be obtained only using cytology smears, plus the analysis of the whole LN with the OSNA assay. The combination of LN cytology smears and the OSNA assay performed on the entire LN tissue would allow to obtain more reliable data of the LN status in CRC.

A limitation of our study is the inevitable tumour allocation bias, since two parts of the LN were used for the different determinations. Nevertheless, the conventional LN assessment by H&E is far more questionable regarding its reliability to diagnose micrometastases, as only 2–5 microns of the LN tissue are analysed with H&E, and the rest of the LN is either left in the paraffin block or in the formalin. Another limitation is the assessment of the size of LN metastases by cytology smears [43]. Nevertheless, the size of LN metastases in CRC is not as determinant as it is in breast carcinoma since the lymphadenectomy is performed with the colorectal surgical procedure.

Our results have shown that LN cytology smears are a feasible method for pN staging in CRC, which allows us to integrate the OSNA assay into daily practice pathological diagnosis of early-stage CRC. This procedure would allow for the preservation of a morphology-based pN stage performed with the use of cytology smears, i.e., the number of positive LNs, which meet the current pN stage guidelines, and proceed with the entire molecular LNs analysis.

5. Conclusions

We conclude that cytology-based LN analysis not only enables the performance of the pN stage in CRC but is more accurate and sensitive than H&E to detect LN metastases. It results to have a higher positive patient detection rate than H&E, being comparable to highly sensitive LN molecular analysis. It is a very promising approach and a possible alternative to the conventional pathological pN stage. Using cytology pN stage would enable to use of the whole LN tissue for molecular analysis, which could help to better stage and detect CRC patients at risk of recurrence.

Author Contributions: Conceptualization, M.C.; methodology, M.C., S.D.-M., I.A., J.T., S.L. (Stefania Landolfi), A.C. (Angel Concha) and M.T.R.-C.; software, S.L. (Sara Lahoz); validation, S.L.-P., M.C., J.C., A.C. (Antoni Castells), F.B. and S.L. (Sara Lahoz); formal analysis, S.L. (Sara Lahoz); investigation, S.L.-P., I.M., M.C. and J.C.; resources, M.C., J.C., F.B. and A.C. (Antoni Castells); data curation, S.D.-M., I.A., J.T., M.T.R.-C., S.L.-P., A.C. (Angel Concha), I.M., J.M., N.C. and S.L. (Stefania Landolfi); writing—original draft preparation, S.D.-M., M.T.R.-C., S.L.-P., J.T., S.L. (Stefania Landolfi), N.C., A.C. (Angel Concha) and M.C.; writing—review and editing, M.C., J.C., J.M., F.B., I.A., I.M., A.C. (Antoni Castells) and S.L. (Sara Lahoz); visualization, I.A., J.M., N.C. and S.L. (Sara Lahoz); supervision, M.C.; project administration, M.C. and J.C.; funding acquisition, M.C., J.C., F.B. and A.C. (Antoni Castells) All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria grant number PI17/01304, PI20/00863, awarded to M.C. and J.C. We acknowledge the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (Generalitat de Catalunya, GRC 2017SGR653). This article is based upon work from COST Action CA17118, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). www.cost.eu. S.L. holds a PFIS grand from Instituto de Salud Carlos iii and co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF) (FI18/00221).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Hospital Clinic of Barcelona (Reg. 2012/7324), and by the ethic and scientific committees of all centres. All patients signed the informed consent to participate in the study.

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

Data Availability Statement: Data are available from the authors upon reasonable request.

Acknowledgments: We acknowledge the administrative support given by Banc de Tumors-Biobanc Hospital Clinic-IDIBAPS and the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC), sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (PDO). Sysmex S.L. provided technical support. We also acknowledge the support of the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya and from CIBEREHD, funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Gunderson, L.L.; Jessup, J.M.; Sargent, D.J.; Greene, F.L.; Stewart, A.K. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 264–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. NCCN. Colon Cancer. In *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2018; p. 392. [[CrossRef](#)]
3. Williams, J.L.; Chan, C.K.; Toste, P.A.; Elliott, I.A.; Vasquez, C.R.; Sunjaya, D.B.; Swanson, E.A.; Koo, J.; Hines, O.J.; Reber, H.A.; et al. Association of histopathologic phenotype of periampullary adenocarcinomas with survival. *JAMA Surg.* **2017**, *152*, 82–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kubisch, C.H.; Crispin, A.; Mansmann, U.; Göke, B.; Kolligs, F.T. Screening for Colorectal Cancer is Associated with Lower Disease Stage: A Population-Based Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**. [[CrossRef](#)]
5. Quintero, E.; Castells, A.; Bujanda, L.; Cubiella, J.; Salas, D.; Lanas, Á.; Andreu, M.; Carballo, F.; Morillas, J.D.; Hernández, C.; et al. Colonoscopy versus Fecal Immunochemical Testing in Colorectal-Cancer Screening. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 697–706. [[CrossRef](#)]
6. Schreuders, E.H.; Ruco, A.; Rabeneck, L.; Schoen, R.E.; Sung, J.J.Y.; Young, G.P.; Kuipers, E.J. Colorectal cancer screening: A global overview of existing programmes. *Gut* **2015**, *64*, 1637–1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Castells, A.; Quintero, E.; Álvarez, C.; Bujanda, L.; Cubiella, J.; Salas, D.; Lanas, A.; Carballo, F.; Morillas, J.D.; Hernández, C.; et al. Rate of detection of advanced neoplasms in proximal colon by simulated sigmoidoscopy vs. fecal immunochemical tests. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *12*, 1708–1716.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cunningham, D.; Atkin, W.; Lenz, H.-J.; Lynch, H.T.; Minsky, B.; Nordlinger, B.; Starling, N. Colorectal cancer. *Lancet* **2010**, *375*, 1030–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. 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](#)]

10. Compton, C.; Fenoglio-Preiser, C.M.; Pettigrew, N.; Fielding, L.P. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference: Colorectal working group. *Cancer* **2000**, *88*, 1739–1757. [[CrossRef](#)]
11. Washington, M.K.; Berlin, J.; Branton, P.; Burgart, L.J.; Carter, D.K.; Fitzgibbons, P.L.; Halling, K.; Frankel, W.; Jessup, J.; Kakar, S.; et al. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. College of American Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, *133*, 1539–1551. [[CrossRef](#)]
12. 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](#)] [[PubMed](#)]
13. Iddings, D.; Ahmad, A.; Elashoff, D.; Bilchik, A. The prognostic effect of micrometastases in previously staged lymph node negative (N0) colorectal carcinoma: A meta-analysis. *Ann. Surg. Oncol.* **2006**, *13*, 1386–1392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. 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](#)]
15. Archilla, I.; Díaz-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](#)]
16. 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](#)]
17. Rubio, I.T.; Espinosa-Bravo, M.; Rodrigo, M.; Amparo Viguri Diaz, M.; Hardisson, D.; Sagasta, A.; Dueñas, B.; Peg, V. 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*, 371–380. [[CrossRef](#)]
18. Cordoba, O.; Perez-Ceresuela, F.; Espinosa-Bravo, M.; Cortadellas, T.; Esgueva, A.; Rodriguez-Revuelto, R.; Peg, V.; Reyes, V.; Xercavins, J.; Rubio, I.T. Detection of sentinel lymph node in breast cancer recurrence may change adjuvant treatment decision in patients with breast cancer recurrence and previous axillary surgery. *Breast* **2014**, *23*, 460–465. [[CrossRef](#)]
19. 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 tumor load in sentinel lymph node: A new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *139*, 87–93. [[CrossRef](#)]
20. Espinosa-Bravo, M.; Navarro-Cecilia, J.; Ramos Boyero, M.; Diaz-Botero, S.; Dueñas Rodríguez, B.; Luque López, C.; Ramos Grande, T.; Ruano Perez, R.; Peg, V.; Rubio, I.T. Intraoperative assessment of sentinel lymph node by one-step nucleic acid amplification in breast cancer patients after neoadjuvant treatment reduces the need for a second surgery for axillary lymph node dissection. *Breast* **2017**, *31*, 40–45. [[CrossRef](#)]
21. 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](#)]
22. 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](#)]
23. 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](#)] [[PubMed](#)]
24. 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](#)]
25. McGovern, J.; Fuller, C.; Burris, K. Anal cancer screening and prevention: A review for dermatologists. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2021**, *35*, 1622–1627. [[CrossRef](#)]
26. Kyrgiou, M.; Arbyn, M.; Bergeron, C.; Bosch, F.X.; Dillner, J.; Jit, M.; Kim, J.; Poljak, M.; Nieminen, P.; Sasieni, P.; et al. Cervical screening: ESGO-EFC position paper of the European Society of Gynaecologic Oncology (ESGO) and the European Federation of Colposcopy (EFC). *Br. J. Cancer* **2020**, *123*, 510–517. [[CrossRef](#)]
27. Al-Abbadi, M.A. Basics of cytology. *Avicenna J. Med.* **2011**, *1*, 18–28. [[CrossRef](#)]
28. Harnish, B.; Nidhi, V.; Neena, D. Usefulness of touch Imprint Cytology in Cancer diagnosis: A study of 119 cases. *Int. Res. J. Med. Sci. Int. Res. J. Med. Sci* **2014**, *2*, 2320–2353.
29. Iacuzzo, C.; Troian, M.; Bonadio, L.; Bonazza, D.; Dobrinja, C.; Bellio, G.; Scomersi, S.; Giudici, F.; Zanconati, F.; Bortul, M. Evaluation of Sentinel Lymph Node Intraoperative Touch Imprint Cytology in Breast Cancer Surgery. *J. Mol. Biomark. Diagn.* **2017**, *8*, 6–10. [[CrossRef](#)]
30. 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](#)]

31. Mori, Y.; Nagamine, K.; Tomita, N.; Notomi, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 150–154. [[CrossRef](#)]
32. 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](#)] [[PubMed](#)]
33. Croner, R.S.; Geppert, C.-I.; Bader, F.G.; Nitsche, U.; Späth, C.; Rosenberg, R.; Zettl, A.; Matias-Guiu, X.; Tarragona, J.; Güller, U.; et al. Molecular staging of lymph node-negative colon carcinomas by one-step nucleic acid amplification (OSNA) results in upstaging of a quarter of patients in a prospective, European, multicentre study. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 2544–2550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pahlman, L.A.; Hohenberger, W.M.; Matzel, K.; Sugihara, K.; Quirke, P.; Glimelius, B. Should the Benefit of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer Be Re-Evaluated? *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 1297–1299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. 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 tumor burden. *Surg. Endosc. Other Interv. Tech.* **2016**, *31*, 723–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yamamoto, H.; Murata, K.; Fukunaga, M.; Ohnishi, T.; Noura, S.; Miyake, Y.; Kato, T.; Ohtsuka, M.; Nakamura, Y.; Takemasa, I.; et al. Micrometastasis Volume in Lymph Nodes Determines Disease Recurrence Rate of Stage II Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3201–3208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. 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](#)]
38. Croner, R.S.; Schellerer, V.; Demund, H.; Schildberg, C.; Papadopoulos, T.; Naschberger, E.; Stürzl, M.; Matzel, K.E.; Hohenberger, W.; Schlabrakowski, A. One step nucleic acid amplification (OSNA)—A new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *J. Transl. Med.* **2010**, *8*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wanebo, H.J.; LeGolvan, M.; Paty, P.B.; Saha, S.; Zuber, M.; D’Angelica, M.I.; Kemeny, N.E. Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. *Clin. Exp. Metastasis* **2012**, *29*, 821–839. [[CrossRef](#)]
40. 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](#)]
41. Sansano, I.; Vieites, B.; Sancho de Salas, M.; García, C.; Amendoeira, I.; Bernet, L.; Pérez-García, J.M.; Espinosa-Bravo, M.; Rubio, I.T.; Ramón y Cajal, S.; et al. Axillary staging based on molecular analysis: Results of the B-CLOSER-II study. *Pathol.—Res. Pract.* **2020**, *216*, 153197. [[CrossRef](#)]
42. Vieites, B.; López-García, M.; Martín-Salvago, M.D.; Ramirez-Tortosa, C.L.; Rezola, R.; Sancho, M.; López-Vilaró, L.; Villardell, 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](#)] [[PubMed](#)]
43. Cipolla, C.; Graceffa, G.; Cabibi, D.; Gangi, G.; Latteri, M.; Valerio, M.R.; Vieni, S. Current role of intraoperative frozen section examination of sentinel lymph node in early breast cancer. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 1711–1717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

DISCUSIÓN

DISCUSSION GENERAL

El manejo terapéutico del cáncer colorrectal (CCR) en estadio II (T3-T4 N0) plantea un dilema clínico debido a la falta de suficiente evidencia científica que respalde la implementación rutinaria de quimioterapia adyuvante. Esto es debido a que no se ha demostrado el beneficio de la misma, a los riesgos de toxicidad asociada y en menor medida a los considerables costes de este enfoque terapéutico. Sin embargo, es importante señalar que la quimioterapia adyuvante ha demostrado ser efectiva y está indicada en pacientes en estadio III de la enfermedad, es decir, en pacientes que presentan ganglios linfáticos positivos.

Aunque persiste la controversia en cuanto al tratamiento en etapas tempranas, el impacto positivo de la quimioterapia adyuvante en estadios más avanzados proporciona una base sólida para considerar su empleo en un grupo selecto de pacientes con ganglios negativos, pero con alto riesgo de recidiva, siendo especialmente relevante en estadio IIB (T4 N0). No obstante, esta consideración se basa en el análisis de los ganglios linfáticos con el procedimiento convencional, utilizando HE, que puede resultar en falsos pN0 en fases iniciales de la enfermedad, debido a que las metástasis a ganglios linfáticos son de pequeño tamaño. Por ello, la decisión de administrar terapia adyuvante sigue siendo arbitraria, basada en probabilidades de riesgo, y no en el análisis completo del ganglio linfático con técnicas más sensibles, como un análisis molecular, tal como se realiza en los ganglios linfáticos centinela de las pacientes con cáncer de mama.

El estadiaje ganglionar del CCR convencional se realiza con el análisis de secciones histológicas de los GLs teñidas con HE. La OMS requiere el estudio de un mínimo de 12 GLs para asegurar un verdadero estadio pN0, debido a que con HE se estudia únicamente una o varios cortes centrales de los GLs,

quedando gran parte del material ganglionar por analizar, por lo que su sensibilidad es baja.

Los programas de cribado de CCR han creado un nuevo escenario clínicopatológico con dos consecuencias importantes: primero, la reducción de la tasa de mortalidad por CCR, y segundo, un incremento en la detección de CCR en estadios precoces de la enfermedad, lo que conlleva a que se diagnostican un gran número de pacientes potencialmente curables. Así, el 70% de los CCR que se diagnostican en el contexto de programas de cribado están en estadios I-II (T1-4 N0). Una de las limitaciones del estadiaje pN con HE de los CCR en estadios precoces es la evidencia de su baja sensibilidad para una correcta estadificación ganglionar. Ello conlleva a la falta de una base convincente que permita asegurar la curación tras resección quirúrgica o el beneficio de la quimioterapia sobre la supervivencia en pacientes con factores histológicos de riesgo de progresión. Por ello, los pacientes con CCR en estadio II siguen siendo un desafío importante en la práctica clínica. En consecuencia, nos planteamos mejorar el estadiaje histopatológico de los ganglios linfáticos para poder dar respuesta a esta nueva ecuación y poder asegurar que aquellos pacientes con estudio ganglionar por OSNA que tengan cargas tumorales bajas se asocian con una ausencia total de recurrencias, lo que sugiere que los valores de la CTT de OSNA tienen un alto valor predictivo para la ausencia de recurrencias.

La utilización de métodos moleculares para el estadiaje ganglionar ha evolucionado desde el uso de metodologías complejas, costosas y de difícil implementación en la práctica clínica, hasta la técnica de OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification), que es un método estandarizado, automatizado, rápido y de fácil incorporación en la rutina clínica diaria. Se trata de una metodología basada en RT-PCR que utiliza la RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification), con resultados cuantitativos de la cantidad de copias de mRNA de CK19 presentes en los GLs de las piezas de

resección quirúrgica de CCR. La CTT se correlaciona con la cantidad de células tumorales presentes en los ganglios linfáticos. Así, inicialmente, cuando se validaron los resultados de OSNA en carcinoma de mama y colon, se estableció una relación entre la CTT y el tamaño de las metástasis, siendo <250 copias mRNA CK19/ μ L un resultado negativo, entre 250 y 5000 copias mRNA CK19/ μ L correspondía a micrometástasis y >5000 copias mRNA CK19/ μ L correspondía a macrometástasis. Posteriormente, se objetivó tanto en carcinoma de mama como en colon, que esta correlación no se correspondía con la realidad clínica de los pacientes.

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 CCR *in situ*, como demostró nuestro grupo, donde los valores de CTT por debajo de 6.000 copias/ μ L no tuvieron significación clínica. Sugirieron que estos valores de CTT podrían representar la presencia de células tumorales aisladas en GLs de CRC *in situ* (65).

Los resultados del análisis ganglionar por OSNA han demostrado ser más sensibles que la HE, tanto en carcinoma de mama como en el CCR. Así, en el carcinoma de mama, el estudio del ganglio linfático centinela con la técnica OSNA ha facilitado el análisis intraoperatorio del GL, con lo que se consigue evitar segundas cirugías, disminuyendo de esta manera además el número de complicaciones asociadas y permite un inicio más rápido de las terapias adyuvantes en la mayoría de los pacientes.

También se han evidenciado en otros estudios realizados para establecer la estadificación ganglionar del cáncer de mama mediante la técnica de OSNA valores predictivos y pronósticos después de la realización de terapias sistémicas neoadyuvantes, algo que en un principio no se realizaba de manera

rutinaria. Esto permitió clasificar a las pacientes en diferentes grados de riesgo de recurrencia de la enfermedad y de supervivencia libre de enfermedad según los valores de la CTT, independientemente de otros factores de riesgo.

Así, otros estudios en cáncer de mama donde se realizó el análisis de los GLs mediante técnica de OSNA, se demostró el valor pronóstico y predictivo de recidiva sobreañadida a la CTT en estas pacientes, donde valores de CTT >25,000 copias/ μ L incrementaban considerablemente el riesgo de recurrencia de la enfermedad. Con estos resultados se acentúa el importante valor del análisis ganglionar mediante OSNA aún después de la primera línea de tratamiento sistémico.

En CCR se ha demostrado en publicaciones europeas de nuestro grupo y otros, y en publicaciones japonesas que el estudio de los GLs con OSNA consigue un mejor estadiaje ganglionar de los pacientes con CCR. Así, en comparación con otras técnicas diagnósticas se ha demostrado que la CCT detecta los GLs positivos y se relaciona con mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad. Además, hemos demostrado que la CCT tiene valor pronóstico y se asocia a peor supervivencia global y libre de enfermedad cuando las CTT son superiores a 6.000 copias mRNA CK19/ μ L. También hemos observado que es una técnica útil para establecer un seguimiento más estrecho o incluso tratar a aquellos pacientes con CCR pT1 y CTT altas (66).

El primer trabajo de la presente tesis doctoral, "Budget Impact Analysis of Molecular Lymph Node Staging Versus Conventional Histopathology Staging in Colorectal Carcinoma" es un estudio sobre el impacto económico que representaría la utilización de la técnica de OSNA para el estadiaje ganglionar en CCR en estadio II, en lugar del análisis convencional de los ganglios linfáticos con HE.

Demuestra que el hecho de invertir más la etapa inicial del diagnóstico, realizando el análisis de los GLs con OSNA en lugar del método de estadiaje convencional con HE, no únicamente tiene un impacto económico positivo para el SNS, sino que se demuestra un ahorro excepcional del coste global de un paciente con CCR, superando el 85% de costes. El hecho es que la técnica de OSNA tiene un valor predictivo negativo del 98%, por lo que aquellos pacientes con ganglios negativos analizados con OSNA serían negativos verdaderos y podrían beneficiarse de menos pruebas durante los años de seguimiento, dado que se considerarían curados.

Un aspecto significativo de la técnica OSNA radica en su alta sensibilidad para la detección de la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos, por lo que nuestros resultados proporcionan una valiosa evidencia sobre la utilidad del análisis de los GLs con OSNA para el estadiaje ganglionar de pacientes con CCR precoz. Por ello, debería considerarse en el contexto de cribado poblacional de CCR. Esta técnica es capaz de detectar la presencia de celularidad tumoral en GLs que podría pasar desapercibida con HE. En consecuencia, se logra una estadificación más precisa de los pacientes, permitiendo la identificación de aquellos que podrían beneficiarse de tratamiento adyuvante tras la cirugía, lo que a su vez brinda una oportunidad única de disminuir considerablemente la capacidad de progresión de la enfermedad, mejorando la posibilidad de curación y reduciendo el riesgo de recidiva.

El estudio destaca cómo OSNA permite el tratamiento oportuno de pacientes en estadios tempranos, un beneficio que no se logra con el método convencional de estadiaje ganglionar con HE. Los pacientes con GLs positivos que no serían detectados con el análisis con HE perderían la oportunidad de recibir terapia adyuvante, pudiendo evolucionar posteriormente con recidivas o metástasis a distancia. Esto último no solo tienen un impacto pronóstico negativo para los pacientes, sino que también resulta en reintervenciones y

tratamientos oncológicos a mediano plazo, con un incremento del gasto sanitario y una carga económica adicional para el Sistema Nacional de Salud español.

Considerando los costes de los recursos utilizados en el seguimiento de los pacientes con CCR, incluyendo visitas médicas, analíticas con detección de CEA, pruebas de imagen (TAC), colonoscopias regladas y tratamientos administrados durante un seguimiento estándar de 5 años, representa una cuantía considerable en euros.

La posibilidad de obtener un estadiaje ganglionar fiable y preciso de los pacientes con CCR en estadios precoces, utilizando un método en el que los pacientes en estadio pN0 serían reales, se podría transformar la calidad y cantidad del seguimiento de estos pacientes, y enfocar una monitorización más intensiva en aquellos pacientes con GLs positivos y que verdaderamente requieren una monitorización más estrecha. Todo ello conllevaría una reducción substancial de los costes asociados al seguimiento de los pacientes con CCR. Con este estudio hemos demostrado que en caso de la utilización de la técnica OSNA, se podría disminuir considerablemente la carga monetaria al Sistema Nacional de Salud español.

De esta manera, nuestra propuesta no solo se alinea con la búsqueda de métodos eficaces y prácticos, sino que también sienta las bases para una atención médica más dirigida y económicamente eficiente. En un entorno donde los recursos son limitados, el enfoque en la sensibilidad y la estrategia de seguimiento personalizado podría marcar una diferencia fundamental en la calidad de vida de los pacientes y una mejora en la administración de los recursos sanitarios disponibles.

En resumen, el análisis de costes realizado en este estudio respalda firmemente la implementación de OSNA en el estadiaje de GLs en pacientes

con carcinoma colorrectal en estadios precoces. Esta técnica no solo mejora la precisión en la estadificación de los pacientes, lo que es una ventaja para los mismos y un incremento en la calidad asistencial, sino que también conlleva ahorros económicos en los primeros años de seguimiento para el Sistema Nacional de Salud español. Además, lo que es aún más importante, es que ofrece una oportunidad valiosa para el tratamiento temprano de pacientes con ganglios linfáticos positivos (verdaderos estadios III) que no serían detectados con HE, contribuyendo a un manejo más efectivo del paciente.

En conclusión, la inversión en diagnóstico y estadiaje es coste-efectiva y representa un beneficio para el paciente, ofreciéndole el tratamiento y seguimiento más adecuado, incrementa la calidad asistencial, a la vez que hemos demostrado que es un beneficio económico para el Sistema Nacional de Salud español.

El segundo trabajo de la presente tesis doctoral “Cytology smears: An enhanced alternative method for colorectal cancer pN stage. A multicentre study”, se basa en una estrategia innovadora para demostrar la no inferioridad del estadiaje pN utilizando extensiones citológicas de los GLs, respecto al estadiaje pN obtenido con HE. Este estudio representa un paso previo al objetivo final del estadiaje ganglionar del CCR con OSNA, que es el de poder utilizar todo el ganglio linfático para el análisis molecular mediante la técnica de OSNA, sin sacrificar el estadiaje convencional pN realizado con HE. Para ello, realizamos extensiones citológicas de los GLs en fresco de CCR, con posterior tinción inmunocitoquímica para CK19.

El estudio de las improntas citológicas de los GLs de pacientes con CCR, mediante el análisis por OSNA, destaca por ser el más extenso realizado hasta la fecha. Se trata de un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico, en

el cual evaluamos la capacidad de estadiaje de los GLs (pN) utilizando el análisis de improntas citológicas de GLs inmunoteñidas con CK19.

En nuestro estudio no se utilizó todo el ganglio para el análisis con OSNA, dado que el principal objetivo del proyecto era determinar si se podía establecer el estadio pN utilizando extensiones citológicas de los GLs. Se compararon los resultados del estadiaje pN obtenidos de las improntas citológicas con los resultados del estadiaje pN estándar con HE, así como con los valores de la carga tumoral total obtenidos con OSNA.

Este estudio incorpora un enfoque integral y compara las tres técnicas distintas de estadiaje ganglionar en CCR (improntas citológicas inmunoteñidas con CK19, HE y OSNA), lo que representa un paso intermedio, previo al uso de todo el GL para el estadiaje molecular mediante la técnica de OSNA.

Demostramos de manera convincente la capacidad de realizar el estadiaje pN en todos los pacientes con CCR mediante el análisis de improntas citológicas inmunoteñidas con CK19. Esto permitiría en un futuro utilizar todo el GL para el análisis molecular con OSNA. De esta manera se obtendrían ambos, el estadio pN y el resultado de OSNA en forma de carga tumoral total, definida como la cantidad de copias de ARNm de CK19 tumoral presente en todos los ganglios linfáticos de un paciente dado.

Además, demostramos que la citología detectaba un mayor número de ganglios linfáticos positivos que la HE, revelando la superioridad de la citología sobre la HE para detectar la presencia de células tumorales en los GLs. De hecho, observamos que la citología tiene una tasa de detección de GLs positivos comparable al OSNA.

Este hallazgo es especialmente prometedor ya que el uso de improntas citológicas permite obtener un estadio pN más preciso que la HE y posibilita un manejo terapéutico más eficaz y personalizado para estos pacientes. Así, el estudio con extensiones citológicas de los GLs puede sustituir la evaluación de la HE y ser utilizado como método morfológico alternativo para obtener el estadio pN. Además, esta técnica tiene el potencial adicional de facilitar la utilización completa del ganglio linfático para su análisis con OSNA, y así obtendríamos el valor real de la CTT de los pacientes con CCR para así poder obtener un punto de corte con significado clínico y conseguir un mejor manejo terapéutico personalizado.

La inclusión de OSNA como método de referencia en este estudio es crucial, al ser altamente sensible para detectar celularidad tumoral en los GLs y mejorar la estadificación ganglionar de los pacientes con CCR. En caso de positividad, se puede utilizar el tubo de PCR de *back-up* del estudio ganglionar con OSNA para futuras determinaciones moleculares, lo que puede ser de gran utilidad en la identificación de marcadores específicos de aquella fracción del tumor que ha metastatizado a los GLs.

Estos resultados adquieren gran relevancia, ya que nos capacita para integrar de manera efectiva el análisis molecular OSNA en la práctica diagnóstica de CCR en etapas tempranas. Mediante este procedimiento, se logra un equilibrio óptimo entre el estudio morfológico tradicional y la aplicación de tecnologías avanzadas. Esto, a su vez, puede resultar en una mejora en los resultados clínicos y una mayor eficacia en la lucha contra el CCR.

Este proceso de análisis aporta un valor significativo al permitir la conservación del enfoque morfológico a través del uso de extensiones citológicas. Es decir, se realiza el cálculo preciso del número total de GLs positivos, lo cual se ajusta a las directrices actuales para el adecuado estadiaje ganglionar en el contexto del cribado poblacional de CCR. En este sentido, no

solo se preserva la información morfológica esencial para la evaluación del estadio, sino que también se facilita la preparación del GL para el análisis molecular mediante OSNA.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que hemos utilizado únicamente parte del GL para análisis con OSNA. Es necesaria la realización de estudios en los que se utilice el GL completo para análisis molecular, y poder así determinar de forma más fiable el cálculo de la carga tumoral total que pueda correlacionarse con el seguimiento de los pacientes, y de esta manera obtener resultados pronósticos más ajustados a cada paciente. No debemos olvidar los estudios previos de nuestro grupo en los que hemos demostrado que la CTT ganglionar se correlaciona con los factores clínicopatológicos clásicos de riesgo en CCR, además de posicionarla como un factor pronóstico en estadios precoces de la enfermedad.

En conjunto, nuestros estudios representan una contribución importante al campo del estadiaje ganglionar en CCR, no solo debido a su tamaño y alcance multicéntrico, sino también por la rigurosidad metodológica en la realización y comparación de estas técnicas. Los resultados de esta investigación ofrecen información valiosa que puede tener implicaciones significativas en la práctica clínica, al proporcionar una base sólida para la selección de la técnica de estadiaje más adecuada, con consideraciones tanto de sensibilidad como de eficiencia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis de los ganglios linfáticos con OSNA es más sensible que la técnica HE convencional para la detección de ganglios linfáticos positivos.
2. El análisis de los ganglios linfáticos con OSNA en CCR en estadios precoces representa una mejora en la calidad diagnóstica y asistencial.
3. La introducción del OSNA en la práctica clínica diaria del análisis de los GLs de pacientes con CCR en estadio II representa un beneficio para el paciente, ya que permite una estadificación ganglionar más precisa y un tratamiento más adecuado.
4. La introducción del OSNA en el análisis de los GLs en pacientes con CCR en estadio II representa un beneficio económico para el Sistema Nacional de Salud español.
5. Se puede obtener el estadio pN mediante extensiones citológicas inmunoteñidas con CK19, lo que permite una adecuada estadificación ganglionar de los pacientes con CCR.
6. Las extensiones citológicas de los ganglios linfáticos son más sensibles que la HE para detectar células tumorales
7. La sensibilidad de las extensiones citológicas para detectar células tumorales en los ganglios linfáticos de CCR es similar a la del método OSNA.
8. El estadiaje pN con extensiones citológicas permitirá obtener el estadio pN y a la vez realizar el análisis completo de los ganglios linfáticos por OSNA

9. El análisis del ganglio completo por OSNA permitirá establecer valores pronósticos de la carga tumoral total en pacientes con CCR en estadios iniciales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*. 2021 Apr 22;13(9):2025. doi: 10.3390/cancers13092025
2. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of Colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and Risk Factors. *Gastroenterology Review*. 2019 Jan 6;14(2):89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072
3. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2023 Mar 1;73(3):233–54. doi: 10.3322/caac.21772
4. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. 2016;7(3):105–14. doi: 10.12691/jcrt-6-3-4
5. Helsingen LM, Kalager M. Colorectal Cancer Screening — Approach, Evidence, and Future Directions. *NEJM Evidence*. 2022 Jan 9;1(1):EVIDra2100035. doi: 10.1056/EVIDra2100035.
6. Rasool S, Kadla SA, Rasool V, Ganai BA. A comparative overview of general risk factors associated with the incidence of colorectal cancer. *Tumor Biology*. 2013 Jul 6;34(5):2469–76. doi: 10.1007/s13277-013-0876-y
7. Rattray NJW, Charkoftaki G, Rattray Z, Hansen JE, Vasiliou V, Johnson CH. Environmental Influences in the Etiology of Colorectal Cancer: the Premise of Metabolomics. *Current Pharmacology Reports*. 2017 Apr 7;3(3):114–25. doi: 10.1007/s40495-017-0088-z
8. Koyande N, Gangopadhyay M, Thatikonda S, Rengan AK. The role of gut microbiota in the development of colorectal cancer: a review. *International Journal of Colorectal Disease*. 2022 Jun 15;37(7):1509–23. doi: 10.1007/s00384-022-04192-w

9. Hong SN. Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intestinal Research*. 2018;16(3):327-337. doi: 10.5217/ir.2018.16.3.327
10. Armelao F, de Pretis G. Familial colorectal cancer: a review. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(28):9292-8. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9292
11. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020 Jan;158(2):291-302. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.059
12. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013 Aug 7;14(8):16365-85. doi: 10.3390/ijms140816365
13. Schatoff EM, Leach BI, Dow LE. WNT Signaling and Colorectal Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*. 2017 Feb 28;13(2):101-10. doi: 10.1007/s11888-017-0354-9
14. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015 Nov 5;1(15065):15065. doi: 10.1038/nrdp.2015.65
15. Parmar S, Easwaran H. Genetic and epigenetic dependencies in colorectal cancer development. *Gastroenterology Report*. 2022 Jan 1;10. doi: 10.1093/gastro/goac035. eCollection 2022
16. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, et al. Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021 Mar 2;19(3):329-59. doi: 10.6004/jnccn.2021.0012
17. Saraiva S. Colorectal malignant polyps: a modern approach. *Annals of Gastroenterology*. 2021;35(1):17-27. doi: 10.20524/aog.2021.0681
18. Shaukat A, Kaltenbach T, Dominitz JA, Robertson DJ, Anderson JC, Cruise M, et al. Endoscopic Recognition and Management Strategies for

Malignant Colorectal Polyps: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. American Journal of Gastroenterology. 2020 Nov;115(11):1751–67. doi: 10.14309/ajg.0000000000001013

19. Càncer de còlon i recte [Internet]. Canal Salut. Available from: <https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/deteccio-precoc/programes/colon-recte/>

20. Kim SY, Kim HS, Kim YT, Lee JK, Park HJ, Kim HM, et al. Colonoscopy Versus Fecal Immunochemical Test for Reducing Colorectal Cancer Risk: A Population-Based Case–Control Study. Clinical and Translational Gastroenterology. 2021 Apr 30;12(5):e00350. doi: 10.14309/ctg.0000000000000350

21. El Programa de Prevención de Cáncer Colorrectal invita a participar a más de 6.500 olivenses - Gandia - organismes [Internet]. Gandia. Available from: <https://gandia.san.gva.es/ca/-/el-programa-de-prevencion-de-cancer-colorrectal-invita-a-participar-a-mas-de-6-500-olivenses>

22. Triantafillidis JK, Vagianos C, Malgarinos G. Colonoscopy in Colorectal Cancer Screening: Current Aspects. Indian Journal of Surgical Oncology. 2015 Apr 12;6(3):237–50. doi: 10.1007/s13193-015-0410-3

23. Aarons CB, Shanmugan S, Bleier JI. Management of malignant colon polyps: Current status and controversies. World Journal of Gastroenterology. 2014;20(43):16178. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16178

24. Koerner, C., Morris, A., Dinallo, A., Shaffer, V., Balch, G. (2023). Colon. In: Hazen, B.J., Maithel, S.K., Rajani, R.R., Srinivasan, J. (eds) Anatomic, Physiologic, and Therapeutic Principles of Surgical Diseases. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-031-25596-0_15

25. pedunculated – t1 Colorrectal cancer [Internet]. Dutch T1 Colorectal Cancer Working Group. <https://t1crc.com/calculator/pedunculated/>

26. Poston GJ, Tait D, O'Connell S, Bennett A, Berendse S. Diagnosis and management of colorectal cancer: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2011 Nov 9;343(2):d6751. doi: 10.1136/bmj.d6751
27. Aldecoa I, Montironi C, Nuria Planell, 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. *Surgical endoscopy/Surgical endoscopy and other interventional techniques*. 2016 Jun 20;31(2):723–33. doi: 10.1007/s00464-016-5026-3
28. Cancer Protocol Templates. College of American Pathologists. Available from: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates>
29. Sloothaak DAM, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, van der Zaag ES, Tanis PJ, Bemelman WA, et al. 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. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2014 Mar;40(3):263–9. doi: 10.1016/j.ejso.2013.12.002
30. Bork U, Grützmann R, Rahbari NN, Schölch S, Distler M, Christoph Reißfelder, et al. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2014 Jan 1;20(30):10296–304. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10296
31. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017 Jan 17;67(2):93–9. doi: 10.3322/caac.21388
32. Shek D, Akhuba L, Carlino MS, Nagrial A, Moujaber T, Read SA, et al. Immune-Checkpoint Inhibitors for Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic

Review of Clinical Outcomes. *Cancers*. 2021 Aug 27;13(17):4345. doi: 10.3390/cancers13174345

33. Jhaveri KS, Hosseini-Nik H. MRI of Rectal Cancer: An Overview and Update on Recent Advances. *American Journal of Roentgenology*. 2015 Jul;205(1):W42–55. doi: 10.2214/AJR.14.14201

34. Makhoul R, Wilkins K, Alva S. Surveillance and Survivorship after Treatment for Colon Cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2015 Nov 22;28(04):262–70. doi: 10.1055/s-0035-1564435

35. Godhi S, Godhi A, Bhat R, Saluja S. Colorectal Cancer: Postoperative Follow-up and Surveillance. *The Indian Journal of Surgery*. 2017 Jun 1;79(3):234–7. doi: 10.1007/s12262-017-1610-6

36. Cervantes A, Adam R, Roselló S, Arnold D, Normanno N, Taïeb J, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2023 Jan;34(1):10-32. doi: 10.1016/j.annonc.2022.10.003.

37. Zaiba Shafik Dawood, Hamad A, Zorays Moazzam, Alaimo L, Lima HA, Shaikh C, et al. Colonoscopy, imaging, and carcinoembryonic antigen: Comparison of guideline adherence to surveillance strategies in patients who underwent resection of colorectal cancer - A systematic review and meta-analysis. *Surgical oncology*. 2023 Apr 1;47:101910–0. doi: 10.1016/j.suronc.2023.101910. Epub 2023 Feb 14

38. Vacante M, Ciuni R, Basile F, Biondi A. The Liquid Biopsy in the Management of Colorectal Cancer: An Overview. *Biomedicines*. 2020 Aug 26;8(9):308. doi: 10.3390/biomedicines8090308

39. Petrik J, Verbanac D, Fabijanec M, Hulina-Tomašković A, Čeri A, Somborac-Baćura A, et al. Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer: Detection Systems and Clinical Utility. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Jan 1;23(21):13582. doi: 10.3390/ijms232113582

40. Hu M, Wang Z, Wu Z, Ding P, Pei R, Wang Q, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer in the era of precision medicine. *Journal of Molecular Medicine*. 2021 Nov 20;100(2):197–213. doi: 10.1007/s00109-021-02162-3
41. Stejskal P, Goodarzi H, Srovnal J, Hajdúch M, van 't Veer LJ, Magbanua MJM. Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. *Molecular Cancer*. 2023 Jan 21;22(1):15. doi: 10.1186/s12943-022-01710-w
42. Lips DJ, Boukje Koebrugge, Gerrit Jan Liefers, van, Vincent, Pruijt HFM, et al. The influence of micrometastases on prognosis and survival in stage I-II colon cancer patients: the Enroute $\oplus$ Study. *BMC Surgery*. 2011 May 11;11(1). doi: 10.1186/1471-2482-11-11
43. Sinan Omeroglu, Selcuk Gulmez, Uzun O, Aziz Serkan Senger, Ozgur Bostanci, Guven O, et al. Clinical significance of the histopathological metastatic largest lymph node size in colorectal cancer patients. *Frontiers in oncology*. 2023 Mar 6;13:1120753. doi: 10.3389/fonc.2023.1120753. eCollection 2023.
44. 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. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2017 Aug;43(8):1456–62. doi: 10.1016/j.ejso.2017.04.012
45. Diaz-Mercedes S, Archilla I, Camps J, Lacy AM, Iñigo Gorostiaga, Momblan D, et al. Budget Impact Analysis of Molecular Lymph Node Staging Versus Conventional Histopathology Staging in Colorectal Carcinoma. *Applied Health Economics and Health Policy*. 2019 May 21;17(5):655–67. doi: 10.1007/s40258-019-00482-7
46. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology*. 2020 Jul 22;9(8):182. doi: 10.3390/biology9080182

47. Croner RS, Geppert CI ., Bader FG, Nitsche U, Späth C, Rosenberg R, et al. Molecular staging of lymph node-negative colon carcinomas by one-step nucleic acid amplification (OSNA) results in upstaging of a quarter of patients in a prospective, European, multicentre study. *British Journal of Cancer*. 2014 May 1;110(10):2544–50. doi: 10.1038/bjc.2014.170
48. Aldecoa I, Begoña Atares, Jordi Tarragona, Bernet L, Jose Domingo Sardon, 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 Jul 22;469(4):385–94. doi:10.1007/s00428-016-1990-1
49. Yamamoto H, Mitsugu Sekimoto, 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. *Annals of surgical oncology*. 2011 Feb 3;18(7):1891–8. doi: 10.1245/s10434-010-1539-5
50. Yamamoto H, Tomita N, Masafumi Inomata, Tomohisa Furuhashi, Miyake Y, Shingo Noura, et al. OSNA-Assisted Molecular Staging in Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial in Japan. *Annals of Surgical Oncology*. 2015 Oct 5;23(2):391–6.
51. B. Vieites, López-García MÁ, Martín-Salvago MD, C.L. Ramirez-Tortosa, R. Rezola, 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 & translational oncology*. 2021 Jan 31;23(7):1377–85. doi: 10.1007/s12094-020-02530-4
52. M. Espinosa-Bravo, Sansano I, S. Pérez-Hoyos, Ramos M, Sancho M, J. Xercavins, 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 Jul 1;39(7):766–73. doi: 10.1016/j.ejso.2013.03.011

53. Rubio IT, Martín Espinosa-Bravo, M.A. Cucalon Rodrigo, Amparo M, 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 Research and Treatment*. 2014 Aug 28;147(2):371–80. doi: 10.1007/s10549-014-3108-2

54. Namba K, Suzawa K, Kazuhiko Shien, Miura A, Takahashi Y, Miyauchi S, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative diagnosis of lymph node metastasis in lung cancer patients: a single-center prospective study. *Scientific Reports*. 2022 May 4;12(1)7297. doi: 10.1038/s41598-022-11064-4

55. Diestro MD, Berjón A, Zapardiel I, Yébenes L, Ruiz I, Lekuona A, et al. One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) of Sentinel Lymph Node in Early-Stage Endometrial Cancer: Spanish Multicenter Study (ENDO-OSNA). *Cancers*. 2021 Jan 1;13(17):4465. doi: 10.3390/cancers13174465

56. Wang X, Zheng X, Zhu J, Li Z, Wei T. The Diagnostic Accuracy of One-Step Nucleic Acid Amplification for Lymph Node Metastases of Papillary Thyroid Carcinoma : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Endocrinology*. 2022 Jan 4;12. doi: 10.3389/fendo.2021.757766 NO TIENE ISSUE

57. Cuadras M, Planas J, Celma A, Regis L, de Torres IM, Semidey ME, et al. Application of One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) in different cancer entities and usefulness in prostate cancer: a systematic review. *BMC Cancer*. 2022 Apr 2;22(1):357. doi: 10.1186/s12885-022-09355-0

58. Sofía del Carmen, Gatiús S, Guzmán Franch-Arcas, José Antonio Baena, Gonzalez O, Zafon C, et al. Concordance study between one-step nucleic acid amplification and morphologic techniques to detect lymph node metastasis in

papillary carcinoma of the thyroid. *Human Pathology*. 2016 Feb 1;48:132–41. doi: 10.1016/j.humpath.2015.09.020

59. 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. 2012 Jan 1;30(1):60–70. doi: 10.1200/JCO.2011.36.9504

60. Michio Itabashi, Yamamoto H, Tomita N, Masafumi Inomata, 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. *Annals of surgical oncology*. 2019 Nov 13;27(4):1077–83. doi: 10.1245/s10434-019-07971-y

61. Archilla I, Díaz-Mercedes S, José Javier Aguirre, Jordi Tarragona, Machado I, Maria Teresa Rodrigo, et al. Lymph Node Tumor Burden Correlates With Tumor Budding and Poorly Differentiated Clusters: A New Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma? *Clinical and translational gastroenterology*. 2021 Feb 26;12(3):e00303–3. doi: 10.14309/ctg.0000000000000303

62. Rakislova N, Montironi C, Aldecoa I, Eva Sanchez Fernandez, Josep Antoni Bombí, Jimeno M, et al. Lymph node pooling: a feasible and efficient method of lymph node molecular staging in colorectal carcinoma. *Journal of Translational Medicine*. 2017 Jan 14;15(1):14. doi: 10.1186/s12967-016-1114-3

63. Yamamoto H. Micrometastasis in lymph nodes of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterological Surgery*. 2022 May 26;6(4):466–73. doi: 10.1002/ags3.12576

64. Diaz-Mercedes S, Archilla I, Lahoz S, Maria Teresa Rodrigo-Calvo, Lopez-Prades S, Jordi Tarragona, et al. Cytology Smears: An Enhanced Alternative

Method for Colorectal Cancer pN Stage—A Multicentre Study. *Cancers*. 2022 Dec 9;14(24):6072–2. doi: 10.3390/cancers14246072

65. Rodrigo-Calvo MT, 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 (Basel)*. 2023 Jan 30;15(3):842. doi: 10.3390/cancers15030842.

66. Saez de Gordo K, Rodrigo-Calvo MT, Archilla I, Lopez-Prades S, Diaz A, Tarragona J, Machado I, Ruiz Martín J, Zaffalon D, Daca-Alvarez M, Pellisé M, Camps J, Cuatrecasas M. Lymph Node Molecular Analysis with OSNA Enables the Identification of pT1 CRC Patients at Risk of Recurrence: A Multicentre Study. *Cancers (Basel)*. 2023 Nov 20;15(22):5481. doi: 10.3390/cancers15225481.