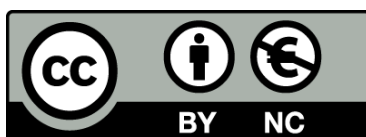




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Valor pronóstico del estadiaje molecular ganglionar en el cáncer colorrectal mediante técnica OSNA

Iván Archilla Sanz



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

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



VALOR PRONÓSTICO DEL ESTADIAJE
MOLECULAR GANGLIONAR EN EL CÁNCER
COLORRECTAL MEDIANTE TÉCNICA OSNA

Memoria de tesis doctoral presentada por

Iván Archilla Sanz

para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por

Dra. Miriam Cuatrecasas Freixas

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

y Jordi Camps Polo

Profesor del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la
Universitat Autònoma de Barcelona

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

Octubre, 2023

Agradecimientos

Todo llega a su fin. Aunque muchos finales no suponen más que el comienzo de algo nuevo; y al fin y al cabo, los recuerdos que tenemos de cada etapa siempre van ligados a todas aquellas personas que nos han acompañado en el camino.

Mis primeras palabras de agradecimiento me gustaría dedicarlas a mis directores de tesis. A Miriam, por saber transmitir su energía, su dedicación y su devoción hacia todo aquello que hace, y por compartirlo con los que la rodean. Por haber confiado en mí desde los primeros años de residencia fomentando mi curiosidad por la especialidad y por un sinfín de proyectos, y por hacerme creer en mí mismo. Y a Jordi, por aportar siempre de forma constructiva, por su experiencia y su visión traslacional, y por haber sabido construir un grupo donde todos aportamos y, a la vez, todos aprendemos de los demás.

Agradecer también a todas aquellas personas del Servicio con las que he compartido tiempo, espacio y conocimientos. Desde el personal facultativo hasta el equipo técnico, sin querer dar nombres por temor a olvidarme de mencionar a alguien. Aunque sí que hay ciertas personas que creo que merecen mención aparte, como son Maite e Iban. A Maite, agradecerle especialmente su compañerismo y constancia; por hacer que, trabajando a su lado, todo sea más fácil y más llevadero. Y a Iban, por conseguir estimular intelectualmente de forma constante, y por creer en mí también desde el primer momento. Y también al resto del equipo de IDIBAPS, en concreto a Vero, Carol y Sara, por acogerme siempre con una sonrisa y dispuestas a ayudar en todo.

A mis padres, por haberme educado con unos valores de los que sentirme orgulloso y que he intentado mantener a lo largo de la vida. Por respetar y apoyar mis decisiones, y por estar ahí siempre que les he necesitado. A Rubén, porque

desde pequeño le he tenido como un ejemplo a seguir, y lo sigo manteniendo. Y en especial a Diego, porque pese a ser el pequeño, siempre he aprendido mucho más de ti de lo que haya podido enseñarte.

Y como no, no puedo dejar de agradecerle a la persona más importante en mi vida; la persona que me ha visto caer mil veces y siempre me ha tendido la mano para levantarme. A ti, Joana, por dejarme volar y, a la vez, hacerme poner los pies en la tierra; por tu paciencia y por todo lo que hemos aprendido el uno del otro durante todo este tiempo.

A todos vosotros, gracias por estar ahí, por acompañarme y por ser parte del camino.

ÍNDICE

Lista de acrónimos.....	10
Artículos de la tesis.....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
1. Cáncer colorrectal.....	15
1.1. Epidemiología.....	15
1.2. Estudios de cribado poblacional	16
1.2.1 Estrategias de cribado poblacional en CCR	17
1.2.1.1 Pruebas de cribado en las heces.....	18
1.2.1.1.1 Sangre oculta en heces (SOH).....	18
1.2.1.1.2 Análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) fecal.....	19
1.2.1.2 Pruebas endoscópicas.....	20
1.2.1.2.1 Colonoscopia	20
1.2.1.2.2 Sigmoidoscopia flexible.....	20
1.2.1.3 Pruebas de imagen.....	21
1.2.1.3.1 Colonografía por tomografía computarizada (CTC).....	21
1.2.1.3.2 Cápsula endoscópica colónica (CEC).....	21
1.2.1.4 Biomarcadores en la sangre periférica.....	22
1.2.1.5 Microbioma fecal.....	23
1.2.2. Cribado poblacional en España.....	23
1.3. Estadificación del cáncer colorrectal.....	24
2 Estadios precoces de CCR.....	27
2.1 Concepto.....	27
2.2 Estimación del riesgo de recidiva en estadios II de CCR.....	28
2.2.1 Factores histológicos.....	29
2.2.1.1 pT4.....	29
2.2.1.2 Evaluación histológica de menos de 12 ganglios linfáticos.....	30
2.2.1.3 Invasión linfovascular	30
2.2.1.4 Invasión perineural.....	31
2.2.1.5 Alto grado histológico.....	31
2.2.1.6 <i>Tumor budding</i> y <i>clusters</i> pobremente diferenciados.....	31
2.2.1.6.1 Definición.....	31
2.2.1.6.2 Gradación.....	32

2.2.1.6.3 Implicaciones pronósticas.....	33
2.2.2 Factores clínicos.....	33
2.2.2.1 Obstrucción y perforación intestinal.....	33
2.2.2.2 Niveles de CEA séricos prequirúrgicos elevados.....	34
2.2.3 Estado del sistema de reparación de errores de la replicación del ADN (MMR).....	34
2.2.4 Nuevos biomarcadores pronósticos en estadios precoces.....	35
2.2.4.1 ADN tumoral circulante (ctDNA).....	35
2.2.4.2 Biomarcadores inmunes.....	36
2.2.4.3 Biomarcadores moleculares.....	37
2.2.4.3.1 Alteraciones en el número de copias (CNAs).....	37
2.3.4.3.2 Perfiles de expresión génica – Subtipos del Consenso Molecular (CMS).....	38
2.3.4.3.3 Mutaciones puntuales.....	40
2.3.4.3.3.1 Mutación de KRAS, BRAF y PIK3CA.....	41
2.3.4.3.3.2 Mutación de SOX9.....	41
2.3.4.3.4 MicroARNs (miRNAs).....	42
3. Estadificación ganglionar.....	42
3.1 Estado actual.....	42
3.2 Ganglio centinela	43
3.3 Técnicas moleculares.....	45
3.3.1 One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA).....	45
3.3.1.1 Procedimiento.....	45
3.3.1.2. OSNA en cáncer de mama.....	47
3.2.2.3 OSNA en cáncer de colon.....	48
3.2.2.4 OSNA en otras neoplasias.....	51
HIPÓTESIS.....	52
OBJETIVOS.....	54
MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS.....	56
DISCUSIÓN.....	86
CONCLUSIONES.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	101

Lista de acrónimos

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AJCC:** *American Joint Committee on Cancer*
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ARNm:** ARN mensajero
- **ASCO:** *American Society of Clinical Oncology*
- **CCR:** Cáncer colorrectal
- **ctDNA:** ADN circulante tumoral (*circulating tumor DNA*)
- **CEC:** Cápsula endoscópica de colon
- **CIMP:** Fenotipo metilador de islas de CpG (*CpG island methylator phenotype*)
- **CK:** Citoqueratina
- **CNA:** Alteración en el número de copias (*Copy number alteration*)
- **CMS:** Subtipo molecular de consenso (*Consensus molecular subtype*)
- **CTC:** Colonografía por tomografía computarizada
- **CTT:** Carga tumoral total
- **ESMO:** *European Society for Medical Oncology*
- **FDA:** *Food and Drug Administration*
- **GL:** Ganglio linfático
- **GC:** Ganglio centinela
- **H&E:** Hematoxilina y eosina
- **Hb:** Hemoglobina
- **IDH:** Índice de Desarrollo Humano
- **IHQ:** Inmunohistoquímica
- **ILV:** Invasión linfovascular
- **IPN:** Invasión perineural
- **IVEM:** Invasión venosa extramural

- **MMR:** *Mismatch repair*
- **MSI:** Inestabilidad de microsatélites
- **MSS:** Estabilidad de microsatélites
- **NLR:** Ratio de neutrófilos/linfócitos (*Neutrophil-to-lymphocyte Ratio*)
- **OSNA:** *One Step Nucleic-acid Amplification*
- **PDC:** Clusters pobremente diferenciados (*Poorly differentiated clusters*)
- **RT-LAMP:** Amplificación isotérmica en loop mediada por transcripción inversa (*Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification*)
- **RT-PCR:** Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real con transcripción inversa (*reverse transcriptase and real-time polymerase chain reaction*)
- **RT-qPCR:** Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (*reverse transcriptase and quantitative real-time polymerase chain reaction*)
- **SOH:** Sangre oculta en heces
- **SOHg:** Sangre oculta en heces mediante el método del guayaco
- **SOHi:** Sangre oculta en heces inmunológico
- **TB:** *Tumor budding*
- **VPN:** Valor predictivo negativo
- **VPP:** Valor predictivo positivo

Artículos de la tesis

Tesis en formato de compendio de publicaciones.

La tesis consta de 4 objetivos y 2 artículos:

- 1) **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., Balaguer, F., Castells, A., Camps, J., & Cuatrecasas, M. (2021). Lymph Node Tumor Burden Correlates With Tumor Budding and Poorly Differentiated Clusters: A New Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma?. *Clinical and translational gastroenterology*, 12(3), e00303.

Factor de Impacto: 4.396 (Q2)

Objetivos:

1. Determinar el valor pronóstico de la carga tumoral total evaluada mediante la técnica OSNA en cáncer colorrectal.
2. Evaluar la correlación de la carga tumoral total con factores de alto riesgo en cáncer colorrectal.

- 2) Diaz-Mercedes, S.*, **Archilla, I.***, Lahoz, S., Rodrigo-Calvo, M. T., Lopez-Prades, S., Tarragona, J., Landolfi, S., Concha, A., Machado, I., Maurel, J., Chic, N., Castells, A., Balaguer, F., Camps, J., & Cuatrecasas, M. (2022). Cytology Smears: An Enhanced Alternative Method for Colorectal Cancer pN Stage-A Multicentre Study. *Cancers*, 14(24), 6072.

* Los autores contribuyeron de igual forma.

Factor de Impacto: 5.2 (Q2)

Objetivos:

1. Comparar la sensibilidad y especificidad de la realización de extensiones citológicas y del análisis ganglionar con la técnica OSNA con respecto a la evaluación histológica convencional para la estadificación ganglionar en cáncer colorrectal.
2. Evaluar el impacto pronóstico de los tres métodos de estadificación ganglionar: H&E, extensiones citológicas y OSNA.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer colorrectal

1.1. Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) representa la tercera neoplasia en incidencia a nivel mundial en ambos sexos, precedido por el cáncer de mama en las mujeres y por el cáncer de pulmón y de próstata en los hombres, suponiendo el primer cáncer en incidencia en España en el año 2020 (1). Se estima que en el año 2020 se diagnosticaron 1,9 millones de casos nuevos en todo el mundo, siendo la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en ambos sexos con 935.000 muertes aproximadamente (2).

No obstante, existe una importante variación en cuanto a la incidencia del cáncer de colon respecto a diferentes regiones geográficas, con la tasa de incidencia más alta en Europa, Australia y Nueva Zelanda y Norteamérica, siendo Hungría y Noruega los países con mayor incidencia en hombres y mujeres, respectivamente. Sin embargo, en cuanto al cáncer rectal existe una tasa de incidencia con una distribución geográfica más uniforme, aunque existen ciertas regiones como el Este de Asia con una incidencia mayor. En cualquier caso, la incidencia tanto para el cáncer colónico como el cáncer rectal tiende a ser menor en la mayoría de regiones de África y del Centro y Sur de Asia.

En este sentido, el CCR puede ser considerado un marcador de desarrollo socioeconómico, ya que presenta una incidencia de hasta 4 veces superior en países desarrollados con respecto a países en vías de desarrollo, donde su incidencia tiende a aumentar de forma uniforme a medida que se incrementa el Índice de Desarrollo Humano (IDH) del país (3), como ha ocurrido en determinados países del Este de Europa, Sudeste Asiático y

Sudamérica (4). Dicho IDH es un indicador elaborado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo que incorpora factores como la esperanza de vida del país, la educación e indicadores de ingreso per cápita. El aumento de la incidencia en países que hasta hace unos años se encontraban en vías de desarrollo refleja cambios en factores ambientales asociados al estilo de vida y dietéticos, lo que generalmente supone un incremento en el consumo de alimentos de procedencia animal, incluyendo carnes rojas o procesadas, así como a un estilo de vida más sedentario y al aumento de consumo de alcohol y de tabaco, suponiendo factores de riesgo independientes de CCR (5).

1.2. Estudios de cribado poblacional

En este contexto, la prevención secundaria continúa siendo la estrategia clave para reducir la creciente incidencia global de CCR. A la hora de diseñar una estrategia de cribado poblacional, se debe tener en cuenta una serie de características tanto de la propia enfermedad, como de la población diana y de la prueba diagnóstica. En cuanto al primer aspecto, la enfermedad debe constituir un importante problema de salud pública y ser percibido por la población como un problema grave para que el programa pueda ser aceptado socialmente. Es fundamental también que se trate de una enfermedad tratable, así como que se conozca la biología e historia natural de la enfermedad con el objetivo de permitir un diagnóstico en una fase preclínica, de manera que se pueda mejorar su pronóstico si el diagnóstico se alcanzara en una fase asintomática. Con respecto a la población susceptible de incorporarse al programa de cribado, ésta debe tener un riesgo moderado, mientras que la prueba diagnóstica a realizar debe ser aceptada por la población y por los profesionales sanitarios, debe ser sencilla, segura, reproducible y válida, con

una adecuada sensibilidad, especificidad y valor predictivo, teniendo en cuenta los riesgos y los costes asociados (6).

1.2.1 Estrategias de cribado poblacional en CCR

Las pruebas de cribado de CCR se pueden agrupar en cuatro grandes categorías, que incluyen a) pruebas en heces, como la detección de sangre oculta en heces (SOH) y la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) fecal, b) pruebas endoscópicas como la colonoscopia y la sigmoidoscopia flexible, c) pruebas de imagen como la colonografía por tomografía computarizada (CTC) y cápsula endoscópica de colon (CEC), y las d) pruebas de detección de biomarcadores en sangre periférica. De todas ellas, la estrategia más comúnmente utilizada para el cribado poblacional en países europeos y asiáticos es la detección de SOH cada dos años, seguida de la colonoscopia y la sigmoidoscopia con o sin test de sangre oculta en las heces inmunológico (SOHi) anual (7).

Pruebas de cribado	Sensibilidad	Especificidad	Frecuencia
Pruebas en heces			
SOHi	79%-91%	90%-94%	1-2 años
SOHg	62%-79%	87%-96%	1-2 años
ADN fecal	92,30%	86,60%	1-3 años
Pruebas endoscópicas y de imagen			
Colonoscopia	78%-93%	94%	10 años
Sigmoidoscopia flexible	ND	ND	5-10 años
CTC	73%-98%	89%-91%	5 años
CEC	81%-87%	76%-98,2%	5 años

Tabla 1 .- Comparación de las principales estrategias de cribado poblacional en CCR. Adaptado de Williams et al (8). SOHi: Sangre oculta en heces inmunológico; SOHg: Sangre oculta en heces mediante el método del guayaco; CTC: Colonografía por tomografía computarizada; CEC: Cápsula endoscópica colónica; ND: No disponible.

1.2.1.1 Pruebas de cribado en las heces

1.2.1.1.1 Sangre oculta en heces (SOH)

Las pruebas de SOH se basan en la detección de hemoglobina fecal, y puede realizarse mediante dos métodos distintos: un método químico, mediante el método de guayaco (SOHg), que se basa en la actividad pseudoperoxidasa del grupo hemo, o parte no proteica de la hemoglobina, que induce la oxidación del guayaco al añadirse peróxido de hidrógeno; y un método inmunológico (SOHi) que se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos dirigidos contra la Hb humana, la albúmina u otros componentes de la sangre fecal (9). Este método puede ser cuantitativo o cualitativo, y no precisa de restricción

dietética o farmacológica alguna, a diferencia del método químico, que es menos específico al detectar la sangre procedente de la dieta, como la que está presente en la carne roja, dando lugar a la aparición de falsos positivos (10).

Por ello, la validez diagnóstica de la prueba de SOHi para detectar CCR avanzado es muy superior a la de la prueba de SOHg (11), habiéndose observado que tanto la adherencia como la detección de CCR avanzado en los programas de cribado es significativamente superior para la prueba de SOHi (12).

1.2.1.1.2 Análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) fecal

El análisis de ADN fecal tiene por objetivo identificar determinadas alteraciones moleculares que se encuentran presentes en distintas lesiones preneoplásicas o neoplásicas, como adenomas, lesiones serradas y CCR, que se encuentran en las heces debido a la exfoliación de las células tumorales intestinales. Se trata de un método no invasivo que no requiere restricciones dietéticas ni medicamentosas, así como tampoco una preparación previa del colon. Algunas plataformas, como Cologuard™, se basan en la detección simultánea de determinados genes asociados a CCR, incorporando el análisis de siete mutaciones de *KRAS*, la mutación de *β-actina* y el estado de metilación de *NDRG4* y de *BMP3*, incorporando también una prueba de SOHi cualitativo en el mismo kit (13). Si bien se ha observado que este tipo de técnicas tienen una sensibilidad superior para la detección de CCR y de lesiones preneoplásicas que la determinación de SOHi, el análisis de ADN fecal presenta una elevada tasa de falsos positivos y una especificidad menor que el test de SOHi (14), además de tratarse de pruebas menos coste-efectivas que la mayoría de las pruebas de cribado poblacional (15). De forma similar, la incorporación de la detección de niveles fecales de determinados

microRNAs, como miR-421 y miR-27a-3p junto con la prueba de SOHi podría mejorar la efectividad y la eficiencia de los programas de cribado (16).

1.2.1.2 Pruebas endoscópicas

1.2.1.2.1 Colonoscopia

La colonoscopia consiste en un procedimiento invasivo que permite la visualización directa de la totalidad de la mucosa colónica y rectal, constituyendo la prueba de referencia en los programas de cribado de CCR en los estudios de validez diagnóstica. No obstante, es necesario que se cumplan una serie de requisitos para que pueda ser considerada como una prueba de buena calidad, como son la necesidad de que la exploración sea completa, alcanzando la observación de la mucosa cecal, una preparación colónica adecuada con determinadas restricciones dietéticas y/o limpieza colónica anterógrada, la necesidad de sedación de los pacientes y una duración adecuada de la colonoscopia. Además de la menor tasa de participación en programas de cribado con este tipo de técnica cuando se compara con la de SOHi (17), tampoco es una prueba exenta de riesgos y de complicaciones, como pueden ser la perforación intestinal, hemorragia, dolor abdominal, y los riesgos derivados de la preparación para la limpieza colónica (18).

1.2.1.2.2 Sigmoidoscopia flexible

La sigmoidoscopia flexible permite la visualización de la superficie mucosa del recto, sigma y parte del colon descendente, para lo que se requiere una preparación previa con enemas, no siendo necesaria la sedación del paciente durante el procedimiento. Cuando se detecta una lesión neoplásica o una lesión precursora mayor de 10 mm durante la sigmoidoscopia, se requiere realizar un estudio completo del colon mediante colonoscopia, debido a la mayor incidencia

de presencia de lesiones sincrónicas proximales (19). La sigmoidoscopia es considerada una técnica relativamente segura, con una menor frecuencia de efectos adversos que los asociados a la colonoscopia, y con una mejor tasa de aceptación por parte de la población, habiendo demostrado una reducción significativa tanto en la incidencia como en la mortalidad asociada a CCR (20).

1.2.1.3 Pruebas de imagen

1.2.1.3.1 Colonografía por tomografía computarizada (CTC)

La CTC consiste en la adquisición de imágenes tomográficas y su posterior reconstrucción por ordenador en tres o cuatro dimensiones para la detección tanto de lesiones precursoras como de CCR. Se trata de una prueba no invasiva que requiere insuflación colónica con aire o dióxido de carbono, así como de una limpieza colónica similar a la de la colonoscopia, sin necesidad de sedación. Se trata de una técnica con una baja tasa de complicaciones, si bien supone un incremento en la exposición de la población a la radiación, así como de la identificación de hallazgos extracolónicos que puedan conllevar un sobretratamiento (21). La CTC presenta una elevada sensibilidad y especificidad en la detección de adenomas de más 6 mm y de neoplasias avanzadas en comparación con la colonoscopia, mientras que las lesiones de menor tamaño pueden no ser identificadas (22).

1.2.1.3.2 Cápsula endoscópica colónica (CEC)

La CEC es una técnica mínimamente invasiva consistente en un dispositivo que posee dos cámaras en su interior que, una vez ingerido, se activa en el íleon terminal y permite visualizar la totalidad de la superficie mucosa colónica mediante la realización de toma de imágenes con una frecuencia variable. A diferencia de las técnicas descritas hasta ahora, no requiere de sedación del

paciente, ni de irradiación ni de insuflación de gas, si bien sí que es necesaria una limpieza colónica previa y el principal efecto adverso consiste en la retención de la cápsula, descrito en una frecuencia del 0,8%, lo que podría eventualmente requerir resección endoscópica o quirúrgica (23). Hasta la fecha, existe información limitada en cuanto a su uso como método de cribado poblacional, si bien las guías del *American College of Gastroenterology* la proponen como una opción para aquellos pacientes que no pueden ser sometidos a una colonoscopia (24).

1.2.1.4 Biomarcadores en sangre periférica

La detección en sangre periférica de determinados biomarcadores diagnósticos, también denominada biopsia líquida, se basa en la detección de ciertas moléculas presentes en la sangre como consecuencia de la acumulación sucesiva de diversas alteraciones genéticas y epigenéticas tanto en lesiones precursoras como en CCR, y se postula como una estrategia prometedora en el cribado poblacional de CCR. Entre las posibles moléculas que podrían ser útiles como biomarcadores se encuentran tanto proteínas, como MicroRNAs (miRNAs) y la detección de distintos estados de metilación del ADN.

Hasta la fecha, únicamente existe un test aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el cribado en personas de riesgo intermedio, aunque no como una opción de primera línea. Se trata del Epi proColon, una prueba que se basa en la detección en sangre periférica de la forma hipermetilada del gen Septina 9 (mSEPT9) (25), un gen supresor de tumores que se encuentra metilado en una gran variedad de neoplasias, incluido el CCR (26). Esta prueba presenta una sensibilidad y especificidad del 68% y 79% respectivamente para la detección de CCR (27).

Otras pruebas basadas en la detección de biomarcadores en sangre periférica no aprobados hasta la fecha incluyen el test TriMeth, basado también en la detección de metilación de tres genes específicos de CCR (*C9orf50*, *KCNQ6* y *CLIP4*) (28); así como otros test basados en firmas de miRNAs (29) o firmas proteicas (30).

1.2.1.5 Microbioma fecal

El microbioma hace referencia al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y metabolitos en un nicho ecológico concreto, como puede ser el intestino humano. La evaluación del microbioma fecal se postula como una modalidad emergente de cribado poblacional de CCR, si bien todavía no ha sido aprobado por la FDA ni se recomienda su uso en población de riesgo medio (31). Su evaluación cuantitativa en heces, o carga bacteriana total, ha demostrado estar significativamente elevada en pacientes con lesiones con displasia de alto grado y con CCR (32); así como la detección de determinados marcadores génicos bacterianos fecales como *Lachnoclostridium* sp., *Fusobacterium nucleatum* y *Clostridium hathewayi* (33).

1.2.2. Cribado poblacional en España

Ante la tendencia al aumento de la incidencia del CCR en nuestro país y el impacto sobre la salud pública que ello supone, la Asociación Española de Gastroenterología y la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria publicaron en 2004 la primera edición de la “Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal”, con posteriores actualizaciones en el 2009 y 2018 (7). En esta guía se recomienda el cribado poblacional con una sola determinación de sangre oculta en heces inmunológica (SOHi) bienal a la población sin factores de riesgo entre los 50 y los 75 años, no siendo recomendando

el cribado mediante la detección de ADN fecal, así como tampoco el cribado con colonoscopia ni CTC. No obstante, en España se realiza cribado bienal desde los 50 hasta los 70 años.

Se estima que en España las tasas de cobertura, participación y adherencia al programa de cribado poblacional se encuentran en torno al 47% en la población diana (34), lo que dista bastante del objetivo que propuso el Ministerio de Salud español en su actualización del año 2021 sobre la “Estrategia en Cáncer del Sistema Nacional de Salud”, donde establecía como objetivo para la detección precoz de CCR alcanzar un mínimo del 65% de participación en programas de cribado (35). Pese a ello, en los programas de cribado implantados en diferentes comunidades de nuestro país se ha observado que el número de CCR diagnosticado en estadios precoces alcanza un porcentaje de entre el 61,4% y el 63,4%, lo que representa una incidencia nada desdeñable (36–38) .

1.3 Estadificación del cáncer colorrectal

El estadiaje patológico del CCR se basa, al igual que en otras neoplasias, en el sistema pTNM, para el que se tiene en cuenta tres parámetros de la neoplasia: pT, que se refiere a la extensión local del tumor, o tamaño tumoral, que en el contexto de CCR hace referencia a la profundidad de infiltración neoplásica; pN o afectación de ganglios linfáticos (GLs) regionales, y pM en función de la presencia o ausencia de metástasis a distancia (39).

El parámetro pT define el grado de infiltración tumoral de la pared colónica. De esta manera, el tumor se clasificará como:

- pTis: si el tumor infiltra la lámina propia / muscularis mucosa, sin sobrepasar ésta última
- pT1: infiltración de la submucosa

- pT2: infiltración de la capa muscular propia, sin sobrepasarla
- pT3: infiltración de la grasa pericolónica o perirrectal
- pT4: si el tumor infiltra directamente el peritoneo visceral y/u otros órganos o estructuras, subclasificándose de esta manera en:
 - pT4a si perfora directamente el peritoneo visceral
 - pT4b si infiltra directamente otros órganos o estructuras

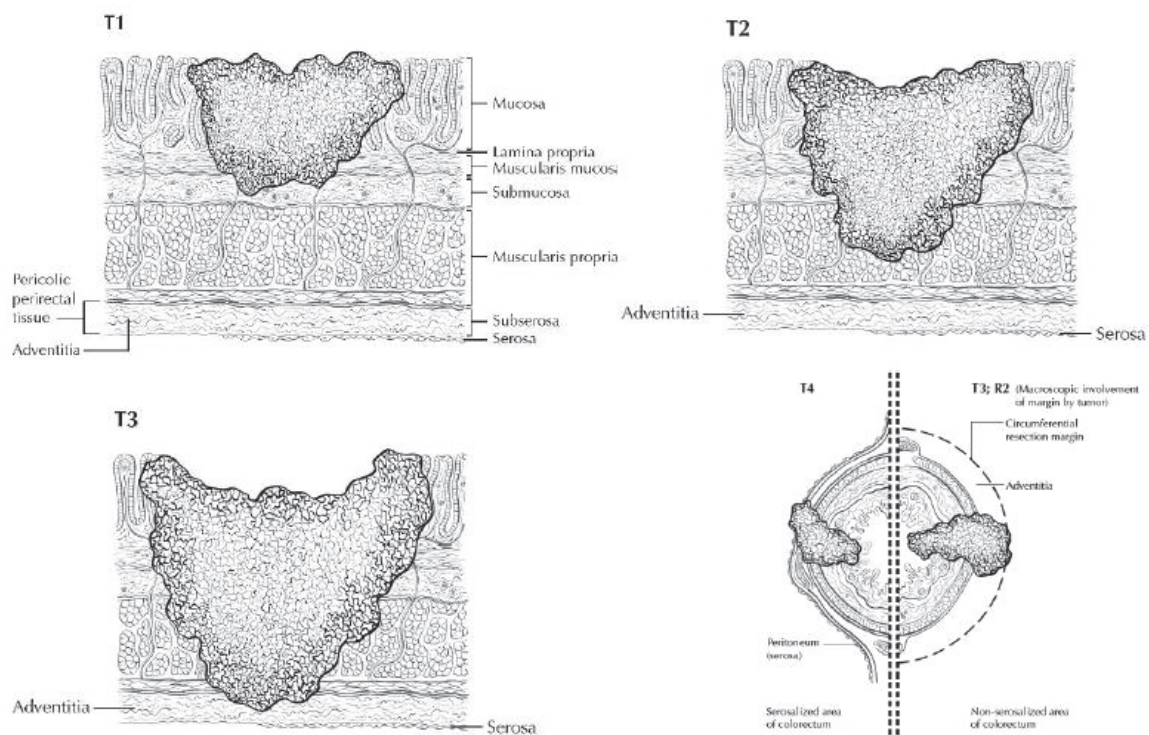


Figura 1.- Estadiaje del CCR en función del grado de infiltración. Adaptado de Washington et al (40).

En cuanto a la categoría pN, el tumor se considerará:

- pN0 si no existen metástasis a GLs regionales
- pN1 si hay presencia de metástasis ganglionar regional en tres o menos GLs regionales:
 - pN1a: metástasis en un GL regional
 - pN1b: metástasis en dos o tres GLs regionales

- pN1c cuando no hay GLs regionales metastásicos, pero existen depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio y/o tejido mesorrectal.
- pN2 si hay presencia de metástasis ganglionar regional en cuatro o más GLs regionales:
 - pN2a: metástasis entre cuatro y seis GLs regionales
 - pN2b: metástasis en siete o más GLs regionales

Por último, la categoría pM se clasifica como:

- pM0 si no hay evidencia de metástasis a distancia
- pM1 si existen metástasis a distancia a uno o más órganos, incluyendo la superficie peritoneal
 - pM1a: metástasis en un órgano único, sin afectación peritoneal
 - pM1b: metástasis en dos o más órganos, sin afectación peritoneal
 - pM1c: metástasis a superficie peritoneal, con o sin afectación de otros órganos a distancia

En base a estos parámetros incluidos en el sistema pTNM, el CCR se puede clasificar clínicamente en diferentes estadios pronósticos (39):

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

Tabla 2 .- Estadios pronósticos en CCR según la AJCC (39).

2. Estadios precoces de CCR

2.1 Concepto

Se consideran estadios iniciales o precoces de CCR aquellos estadios en los que la enfermedad ha sido aparentemente reseca por completo con cirugía, sin evidencia de afectación neoplásica de GLs regionales ni de órganos a distancia, lo que incluye a los estadios I y II (41).

En este contexto, la estimación del riesgo de recidiva es fundamental a la hora de determinar la necesidad de tratamiento adyuvante sistémico. El estadiaje

pTNM continúa siendo el criterio más relevante a la hora de estratificar dicho riesgo después de la cirugía con intención curativa, habiéndose reportado una tasa de supervivencia a los 5 años de la cirugía sin tratamiento adyuvante del 99% para el CCR en estadio I; del 68% al 83% en estadios II y del 45% al 65% para los estadios III (42).

Mientras que el tratamiento adyuvante está recomendado de forma sistemática en todos los estadios III, no ocurre lo mismo con los estadios II. En este escenario clínico, la selección de pacientes que puedan beneficiarse de tratamiento sistémico adyuvante supone un verdadero reto terapéutico, ya que se ha estimado que un 10% y el 15% de los pacientes con CCR en estadio II que no reciben tratamiento adyuvante presentan recidiva de la enfermedad a los 5 años después de la cirugía con intención curativa (43). Por ello, las guías clínicas recogen una serie de parámetros clínico-patológicos asociados a un incremento del riesgo de recidiva que se deben tener en cuenta a la hora de seleccionar a aquellos pacientes que puedan beneficiarse del tratamiento adyuvante.

2.2 Estimación del riesgo de recidiva en estadios II de CCR

Las diferentes guías clínicas de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) y la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) recogen una serie de factores tanto histológicos como clínicos a tener en cuenta para la toma de decisión sobre la necesidad de tratamiento quimioterápico adyuvante en pacientes con CCR en estadio II (42,44). Si bien existe alguna discrepancia sobre los factores clínico-patológicos a tener en cuenta, como por ejemplo los niveles séricos de CEA prequirúrgicos, considerado un criterio menor en la guía de la ESMO, pero no contemplados en la guía de la ASCO, ambas están de acuerdo en la falta de evidencia científica sobre la necesidad de tratamiento adyuvante de forma

rutinaria en estadio II, debiendo seleccionar a aquellos pacientes que presenten un elevado riesgo de recidiva.

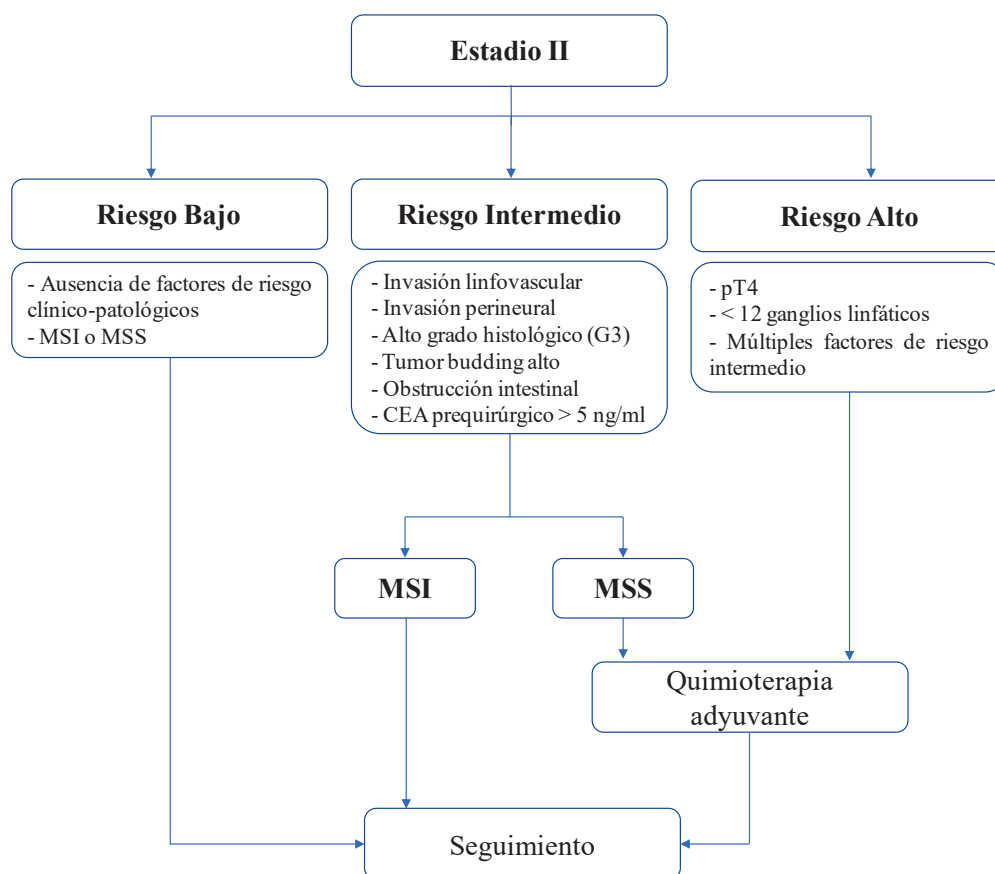


Figura 2.- Recomendaciones para el tratamiento adyuvante en CCR estadio II.
Adaptado de Argilés et al (42).

2.2.1 Factores histológicos

2.2.1.1 pT4

La afectación de la superficie serosa colónica, tanto del peritoneo visceral (pT4a) como la infiltración de órganos adyacentes (pT4b), se asocia a una supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del 51% y a una supervivencia global del 72,2% en pacientes que no reciben tratamiento sistémico adyuvante. Esto supone que los pacientes con estadios pT4a y pT4b pN0 tienen un pronóstico

incluso peor que los estadios IIIA, donde la supervivencia global es del 83,4%; lo que sugiere que un estadio pT4 podría suponer un factor pronóstico incluso peor que la afectación ganglionar regional (45).

2.2.1.2 Evaluación histológica de menos de 12 ganglios linfáticos

El número de GLs examinados en piezas de resección quirúrgica es considerado como un importante factor pronóstico. Así, para asegurar que el estadiaje ganglionar pN0 es fiable y es un verdadero pN0, debe haber una amplia representación de los GLs regionales. Se ha considerado que con el análisis de un mínimo de 12 GLs se puede asegurar que se trata de un verdadero estadio I o II. Para establecer el estadio pN, se analizan los GLs realizando un corte central de los mismos que se procesa y se tiñe con H&E. Al analizarse con H&E únicamente una pequeña porción de los GLs, se deben analizar un número suficiente de GLs para que la negatividad de los mismos sea representativa. Se ha demostrado que el análisis de al menos 12 GLs regionales se asocia a un mejor pronóstico (46,47).

2.2.1.3 Invasión linfovascular

La invasión tanto de vasos de pequeño calibre como de vasos de gran calibre se considera un importante factor pronóstico (48). La invasión de vasos de pequeño calibre se define como el compromiso por parte de la celularidad neoplásica de estructuras de pared fina con presencia de células endoteliales, sin identificar lámina elástica o capa muscular lisa. Estas estructuras vasculares incluyen tanto vasos linfáticos como capilares y vénulas postcapilares, y su afectación neoplásica se considera un factor pronóstico independiente, asociado a la presencia de metástasis ganglionar (49). Por su parte, la invasión de vasos de gran calibre implica la afectación de estructuras vasculares que presentan capa muscular o lámina elástica, distinguiendo invasión intramural, si dichos vasos

están localizados en la submucosa o en la capa muscular propia, o una invasión extramural si se encuentran en el tejido adiposo pericolónico o perirrectal; habiéndose asociado esta última a un aumento del riesgo de metástasis hepáticas por vía sanguínea (50).

2.2.1.4 Invasión perineural

Se define como invasión perineural (IPN) la presencia de celularidad neoplásica rodeando al menos un tercio de la circunferencia de un nervio, pudiendo estar presente en cualquiera de las tres capas nerviosas (epineuro, perineuro y endoneuro) (51). La presencia de IPN se considera un factor pronóstico independiente en CCR (52).

2.2.1.5 Alto grado histológico

La definición del grado histológico según la Organización Mundial de la Salud se basa en la proporción de formación de estructuras glandulares que componen el tumor. De esta manera, se consideran tumores de bajo grado histológico aquellos bien diferenciados (G1, >95% de estructuras glandulares) y moderadamente diferenciados (G2, 50-95% de estructuras glandulares), y tumores de alto grado histológico aquellos pobremente diferenciados (G3, <50% de estructuras glandulares).

2.2.1.6 Tumor budding y clusters pobremente diferenciados

2.2.1.6.1 Definición

El *tumor budding* (TB) y los *clusters* pobremente diferenciados (PDCs) son manifestaciones morfológicas del fenotipo de transición epitelio-mesénquima (EMT), un proceso fisiológico que permite que las células epiteliales adquieran propiedades mesenquimales y potencial de migración e invasión estromal, esencial

para el desarrollo de metástasis (53,54). El TB se define como la presencia de células tumorales aisladas o en grupos formados por hasta 4 células neoplásicas en el frente invasivo del tumor (55), mientras que los PDCs consisten en agregados de al menos 5 células neoplásicas en el estroma tumoral que no forman estructuras glandulares (56). Si bien el TB se considera un factor histológico de alto riesgo en la última guía de la ASCO (44), los PDCs todavía no se consideran como un factor de alto riesgo.

2.2.1.6.2 Gradación

Con el objetivo de estandarizar su reporte en los informes anatomopatológicos, en el año 2016 se estableció el “International Consortium on TB Recommendations” (55). En dicho consorcio se acordó que el TB debe ser evaluado en el margen infiltrante del tumor sobre secciones teñidas con H&E, no estando recomendada su evaluación con tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) para citoqueratinas (CK). Tras un screening a bajo aumento, se selecciona el área que contenga mayor cantidad de *tumor buds* y se cuenta su número en un área de 0.785 mm², que corresponde a un aumento de x200 valorado con una lente ocular de 20 mm de diámetro. Finalmente, en función del número de buds, se gradará en Bd1/bajo (0–4 buds), Bd2/intermedio (5–9 buds) y Bd3/alto (≥10 buds).

En cuanto a los PDCs, la forma más extendida de gradarlos es la que propuso Ueno en el año 2012 (57). Tras un cribado a bajo aumento, se selecciona el área del tumor, ya sea en el centro o en el margen infiltrante, que contenga una mayor cantidad de PDCs. Se cuentan en un campo de aumento x200 y se gradúan de manera similar al TB en tres grados: G1 (0–4 clusters), G2 (5–9 clusters), y G3 (≥10 clusters).

Conviene tener en cuenta algunas particularidades a la hora de reportar estos factores histológicos en carcinomas mucinosos, donde se ha descrito que las células tumorales presentes en los lagos de moco no deberían ser consideradas como TB, sino que únicamente se debe considerar como tal a aquellas células neoplásicas que infiltren el estroma, con mínima mucina extracelular. Sin embargo, distintos autores sí que consideran como PDCs a aquellos grupos neoplásicos que se encuentren dentro de los lagos de mucina, considerando en estos casos que los PDCs deberían gradarse teniendo en cuenta los grupos de células neoplásicas que se encuentren dentro de los lagos de mucina, y no solo aquellos que estén infiltrando el estroma, dado que representarían un índice de agresividad tumoral en los tumores mucinosos (58).

2.2.1.6.3 Implicaciones pronósticas

Tanto el TB como los PDCs han demostrado ser factores pronósticos independientes en CCR, estando asociados a la presencia de metástasis ganglionar, estadio pT alto, mayor grado tumoral, IPN, invasión linfovascular (ILV), invasión vascular extramural (IVEM) y metástasis a distancia no solo en estadios avanzados, sino también en estadios iniciales (54,56). En este aspecto, el TB ha demostrado ser un factor de riesgo para metástasis ganglionares en estadios pT1 (59), así como un importante factor pronóstico independiente en estadios II (60,61).

2.2.2 Factores clínicos

2.2.2.1 *Obstrucción y perforación intestinal*

La obstrucción intestinal secundaria a CCR se considera una situación de urgencia asociada a una alta tasa de morbilidad y mortalidad a corto plazo, así como un factor de mal pronóstico a largo plazo (62). El tratamiento adyuvante en tumores en estadio II oclusivos ha demostrado mejorar tanto la supervivencia

global como la supervivencia libre de enfermedad (63). De la misma manera, se ha observado que la quimioterapia adyuvante en tumores que se presentan con perforación intestinal se asocia a una mejor supervivencia global (64).

2.2.2.2 Niveles de CEA séricos prequirúrgicos elevados

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una proteína que se produce normalmente durante el desarrollo fetal en tejidos tales como el colon, el páncreas y el hígado. Sin embargo, en adultos sanos, los niveles de CEA en la sangre son generalmente bajos o indetectables. No obstante, el CCR suele producir grandes cantidades de esta proteína como resultado de alteraciones en su regulación post-transcripcional. A pesar de ello, sus niveles séricos presentan poca especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad, si bien es una herramienta útil en el seguimiento de los pacientes para ayudar a la detección temprana de enfermedad metastásica. En cuanto a la utilidad de los niveles séricos prequirúrgicos como factor pronóstico, existe cierta controversia (65), si bien algunas guías clínicas consideran unos niveles séricos de CEA >5ng/ml como un factor de riesgo intermedio a tener en cuenta a la hora de valorar la necesidad de tratamiento adyuvante (42).

2.2.3 Estado del sistema de reparación de errores de la replicación del ADN (MMR)

La determinación del estado del sistema de reparación de errores de la replicación del ADN no supone únicamente un factor pronóstico, sino que también sirve como biomarcador predictor al tratamiento adyuvante, así como puede ayudar a determinar ciertas situaciones de predisposición genética.

El estado del MMR se puede determinar mediante diversos métodos, que incluyen la determinación mediante métodos moleculares como PCR para la detección de mutaciones de determinados microsatélites, así como la

determinación mediante IHQ de la expresión proteica de MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 como marcador subrogado del estado de inestabilidad de microsatélites (MSI).

La presencia de MSI en CCR esporádico, descrita hasta en un 15-20% de los casos, define un subgrupo de pacientes con mejor pronóstico y bajo riesgo de recidiva, así como a tumores con una baja sensibilidad al tratamiento quimioterápico adyuvante con fluoropirimidinas, haciendo que el tratamiento adyuvante con este tipo de quimioterapia no esté indicado en estos tumores (66).

2.2.4 Nuevos biomarcadores pronósticos en estadios precoces

2.2.4.1 ADN tumoral circulante (ctADN)

La biopsia líquida consiste en la detección de material genético procedente del tumor en fluidos corporales de pacientes con cáncer. En el contexto de CCR, la estrategia más prometedora de biopsia líquida es la detección de ctADN en plasma, que corresponde a la fracción de ADN libre extracelular presente en el torrente sanguíneo que se origina a partir de procesos como apoptosis, necrosis o secreción tumoral y que se asocia a unas alteraciones genéticas o epigenéticas específicas del tumor.

La detección de ctADN en pacientes con CCR se trata de una técnica poco invasiva que presenta un elevado número de potenciales aplicaciones, incluyendo desde el cribado poblacional, el genotipado tumoral para optimizar terapias dirigidas y el seguimiento de los pacientes, así como proporcionar información pronóstica para guiar el tratamiento después de la cirugía (67). En este sentido, la detección de enfermedad mínima residual después de la resección tumoral ha demostrado ser un importante factor pronóstico de recurrencia en los diferentes estadios tumorales, incluyendo estadios precoces (68), pudiendo ayudar a una

mejor selección de pacientes que pudieran beneficiarse del tratamiento adyuvante, habiéndose observado que hasta el 10-15% de pacientes con CCR estadio II que han sido sometidos a una resección quirúrgica con intención curativa presentan niveles postquirúrgicos detectables de ctADN en plasma (69).

Si bien en los últimos años se han implementado nuevas técnicas de secuenciación de nueva generación que han permitido incrementar notablemente la sensibilidad y especificidad, todavía existe una falta de estandarización de la metodología (70).

2.2.4.2 Biomarcadores inmunes

El microambiente tumoral ha demostrado jugar un papel muy importante en el desarrollo neoplásico. Así, una respuesta inmunitaria pronunciada por parte del huésped hacia el tumor se ha asociado con un incremento de la supervivencia en múltiples neoplasias sólidas, incluido el CCR (71). Parámetros séricos como los niveles de proteína C reactiva, la ratio neutrófilos/linfocitos (NLR) y la proporción plaquetas/linfocitos se han asociado con una peor supervivencia en CCR. En estadios precoces, la alteración del balance entre la celularidad inflamatoria pro y anti-tumoral, evaluada de forma subrogada mediante el NLR, se ha asociado a una peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (72).

Histológicamente, la presencia de una elevada cantidad de linfocitos infiltrantes del tumor, que median la lisis de células tumorales al reconocer la expresión de antígenos anormales presentados a través de las moléculas de HLA de la celularidad neoplásica, así como la presencia de una reacción linfoide de tipo Crohn, caracterizada por agregados linfoides peritumorales, son rasgos histológicos característicos, aunque no exclusivos, de CCR asociados a inestabilidad de microsatélites, y se han asociado a un mejor pronóstico en todos

los estadios tumorales (73). En este sentido, el Immunoscore, una herramienta que evalúa el microambiente inmune peritumoral teniendo en cuenta fundamentalmente la presencia de linfocitos T CD3+ y CD8+ tanto en el margen infiltrante como en el centro del tumor, ha demostrado ser un factor pronóstico en supervivencia libre de enfermedad independiente de edad, sexo, estadio T y N, y MSI (74).

2.2.4.3 Biomarcadores moleculares

En la era de la medicina oncológica de precisión, la identificación de alteraciones moleculares como la alteración en el número de copias (CNAs) de material genético, de determinados perfiles de expresión génica y de mutaciones puntuales podría jugar un importante papel pronóstico en estadios precoces de CCR.

2.2.4.3.1 Alteraciones en el número de copias (CNAs)

Las CNAs hacen referencia a la ganancia o pérdida de material genético en las células neoplásicas en forma de aneuploidía numérica, si existe ganancia o pérdida de cromosomas enteros o de brazos cromosómicos, o de aneuploidía segmentaria o focal si se producen amplificaciones o deleciones específicas. Estas CNAs contribuyen tanto a la iniciación como a la progresión y a la resistencia terapéutica en distintas neoplasias, y se considera que es una consecuencia de la inestabilidad cromosómica derivada de procesos de estrés replicativo y de errores mitóticos, entre otros (75).

En CCR existe un patrón relativamente constante de CNAs, que incluye la ganancia sistemática de los cromosomas 7, 8q, 13q y 20q, mientras que suele presentar pérdidas de los cromosomas 8p, 17p y 18. En cuanto a los estadios precoces de CCR, se ha descrito que los tumores que recidivan presentan una

mayor proporción de CNAs respecto a tumores que no recidivan, siendo la ganancia del cromosoma 13q y la pérdida de heterocigosidad del 17q22–q24.3 las alteraciones más frecuentemente observadas en tumores recurrentes. Adicionalmente, un aumento de la subclonalidad de CNA en las células neoplásicas también se ha asociado a un peor pronóstico en estadios II de CCR (76).

2.2.4.3.2 Perfiles de expresión génica – Subtipos del Consenso Molecular (CMS)

Las CNAs van a afectar de forma directa la expresión de genes localizados en las regiones genómicas alteradas, provocando una desregulación de los niveles de expresión característica de cada perfil de CNA. En concreto, en CCR se ha descrito una correlación entre las CNAs y los niveles de expresión de determinados genes, como la sobreexpresión de *MYC* y de *FAM84B*, localizados en el cromosoma 8q24, que está frecuentemente amplificado (77).

En 2015 se publicó el consenso basado en las clasificaciones descritas hasta la fecha en función de la expresión génica en CCR, donde se definieron 4 subtipos moleculares de consenso (CMS) con rasgos característicos de cada uno de ellos (78). En este consenso se define un primer subtipo, CMS-1 o inestable genómicamente, enriquecido en tumores que presentan mutación de *BRAF*, inestabilidad de microsatélites con un fenotipo metilador de islas de CpG (CIMP) y elevada carga mutacional, asociados a un elevado infiltrado inflamatorio. Este subgrupo presenta una prevalencia del 14% de los CCRs, y se ha asociado a un mejor pronóstico en estadios precoces, mientras que presenta una peor supervivencia cuando el tumor ha recidivado. El subtipo CMS-2 o canónico representa el 37% de los CCRs y se caracteriza por elevados niveles de CNAs y la activación de determinadas vías de señalización, como la vía de *WNT* y de *MYC*.

Los pacientes con CCR en estadio II que presentan este subtipo molecular presentan un peor pronóstico, y podrían beneficiarse del tratamiento quimioterápico adyuvante (79). En el subtipo CMS-3 o metabólico, descrito en el 13% de los CCRs, se incluyen tumores que presentan una desregulación en vías fundamentalmente metabólicas, así como mutación de *KRAS* e inestabilidad de microsatélites, con un menor número de CNAs y no presentan un fenotipo CIMP. Por último, el subtipo CMS-4 o mesenquimal presenta una prevalencia del 23% y es el que se asocia a un peor pronóstico, caracterizado por infiltración estromal, elevada angiogénesis y activación de la vía de señalización de *TGFβ*.

Las dificultades técnicas y económicas para aplicar dicha clasificación de consenso en la práctica clínica diaria han potenciado el desarrollo de diferentes plataformas que permiten calcular puntuaciones genómicas para cuantificar el riesgo de recidiva en muestras incluidas en parafina, de manera similar a como se hace en el cáncer de mama en estadios precoces con el Oncotype DX Breast Recurrence Score (80). En este sentido, el ensayo Oncotype DX Colon Recurrence Score incluye el análisis de expresión de 12 genes, de los cuales 7 están relacionados con el ciclo celular y la respuesta estromal (*Ki-67*, *C-MYC*, *MYBL2*, *FAP*, *BGN*, *INHBA* y *GADD45B*) y 5 genes de referencia para la normalización de los niveles de expresión (*ATP5E*, *PGK1*, *GPX1*, *UBB* y *VDAC2*) (81). Este ensayo ha sido validado en estadios precoces de CCR con y sin tratamiento adyuvante, así como en CCR en estadio III con tratamiento adyuvante, habiendo demostrado su utilidad clínica a la hora de cuantificar el riesgo de recurrencia (82). Estudios posteriores han demostrado que en CCR estadio II sin tratamiento adyuvante, la estratificación en bajo riesgo, intermedio o alto, en función de la puntuación obtenida en el test, se asocia a un riesgo de recidiva del 9%, 14% y 19%, respectivamente, a los 5 años de la cirugía. En este mismo estudio, se observó que

el riesgo de recidiva en aquellos estadios II de alto riesgo (19%) era prácticamente similar al riesgo de recidiva que presentan los CCR en estadio III de bajo riesgo (20%) (83).

Otros ensayos basados en la expresión génica han sido también validados en diferentes estudios, habiendo demostrado su utilidad a la hora de estratificar el riesgo de recidiva en estadios precoces, como el ColDx, que se basa en el estudio de una firma de expresión génica de 634 genes (84,85); o el ensayo ColoMet19, basado en los niveles de expresión de 19 genes, validado en CCR en estadios II, definidos clínicamente como de bajo riesgo y MSS, presentando un valor predictivo positivo (VPP) del 67% para tumores clasificados como de alto riesgo (86).

2.2.4.3.3 Mutaciones puntuales

2.2.4.3.3.1 Mutación de *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*

La vía de señalización de *BRAF-MEK-ERK*, o vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), juega un papel esencial en el proceso de carcinogénesis del CCR, junto con la vía Wnt y la vía *PI3K-PTEN-AKT* (87). Las mutaciones oncogénicas tanto en *KRAS* como en *BRAF* inducen una señalización proliferativa constitutiva, y su implicación pronóstica ha sido ampliamente estudiada en el contexto de CCR en estadio IV o metastásico, donde ha demostrado ser un importante factor predictivo negativo de respuesta a fármacos anti-EGFR (88,89), así como un factor pronóstico, estando asociada su mutación a una peor supervivencia libre de progresión y peor supervivencia global (90).

Sin embargo, en estadios precoces de CCR, la mutación de *KRAS* no ha demostrado tener un valor pronóstico establecido (87,91). En cuanto al papel pronóstico de *BRAF* en estadios II, se ha observado que su mutación está asociada

a un peor pronóstico en tumores MSS, donde su prevalencia es de en torno al 5%, pero no en aquellos tumores que presentan MSI (92,93). De manera similar, la mutación de *PIK3CA* por sí sola tampoco ha conseguido demostrar un valor pronóstico en estadios precoces, si bien se ha descrito que la valoración de su estado mutacional en conjunto con el estado mutacional de *KRAS* y de *BRAF* podría ser un buen marcador pronóstico, tanto para supervivencia libre de progresión como para supervivencia global (91).

2.2.4.3.3.2 Mutación de *SOX9*

SOX9 es un factor de transcripción de la familia *SRY* que juega un papel fundamental en la determinación sexual masculina, así como en la osteogénesis y condrogénesis (94). En los últimos años se ha descrito su implicación en el desarrollo de múltiples tipos de neoplasias, en algunos casos presentando un papel pro-oncogénico, como en el carcinoma hepatocelular y cáncer de mama (95), y en otros casos actuando como gen supresor de tumores (96).

En cuanto a su papel en CCR, estudios *in vitro* sugieren una implicación en la diferenciación celular y la regulación de la homeostasis en el epitelio intestinal, estando implicado en la regulación de células troncales intestinales a través de la vía de Wnt/ β -catenina (97,98). No obstante, pese a que numerosos estudios han descrito que la sobreexpresión de *SOX9* en CCR se asocia a propiedades pro-oncogénicas como proliferación, invasión y promoción de la transición epitelio-mesénquima (99), otros autores han descrito su papel como gen supresor de tumores (100).

Con respecto a su papel pronóstico, se ha descrito que la mutación de *SOX9* está asociada a una mayor supervivencia global en CCR metastásico (101), así como a una menor tasa de recidiva en CCR en estadio II (76).

2.2.4.3.4 MicroARNs (miRNAs)

Los microARNs (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN no codificantes, con una longitud de entre 19 y 25 nucleótidos, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional a través de la degradación o el silenciamiento de las moléculas de ARNm. De manera fisiológica, los miRNAs están implicados en la regulación de multitud de procesos biológicos como la diferenciación celular, apoptosis, proliferación, y el desarrollo embrionario; habiéndose descrito una alteración de su expresión en diferentes tumores, así como su posible implicación en la carcinogénesis y promoción tumoral (102).

En cuanto a su alteración en estadios precoces de CCR, se ha descrito que el aumento de expresión de miR-181c se asocia a un incremento en el riesgo de recidiva (103), así como un aumento en los niveles de miR-21 exosomales circulantes en plasma está relacionado con una peor supervivencia global y peor supervivencia libre de enfermedad (104,105).

3. Estadificación ganglionar

3.1 Estado actual

Como hemos comentado previamente, la afectación metastásica de GLs regionales del CCR es el factor pronóstico más directamente relacionado con supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (106). Las guías clínicas actualmente recomiendan la evaluación histológica de al menos 12 GLs para considerar fiable un estadiaje ganglionar pN0, habiéndose descrito que la supervivencia de pacientes con CCR estadio II está asociada a un aumento del número de GLs evaluados (107). En este aspecto, y debido a las dificultades que a veces puede suponer la disección manual del tejido adiposo pericolónico para identificar GLs de pequeño tamaño, se han propuesto métodos alternativos para

incrementar el número de GLs identificados, como son el aclaramiento de la grasa y la inyección de azul de metileno, que pese a haber demostrado un aumento del número total de GLs disecados, carecen de evidencia suficiente para la detección de GLs positivos y de sobre-estadificación en CCR (108).

Actualmente, la guía del *United Kingdom Royal College of Pathologists* (109) recomienda el análisis histológico del GL completo si el tamaño de este es menor de 4 mm, y la evaluación de una sección central del GL cortado por su eje mayor en GLs más grandes. Para la evaluación histológica ganglionar, se realiza posteriormente una sección de 2 a 4 µm de grosor que se tiñe con hematoxilina y eosina (H&E); lo que representa un volumen ínfimo del total del GL, lo que puede dar lugar a falsos negativos debido a un sesgo de distribución tumoral si las células neoplásicas no están representadas en la sección histológica evaluada, especialmente en el caso de micrometástasis. Con el objetivo de minimizar este sesgo, se han propuesto diferentes alternativas, como la realización de secciones seriadas del mismo GL, así como la realización de técnicas IHQ que permitan incrementar la detección de metástasis ganglionares, sin que exista actualmente ninguna evidencia que recomiende su uso en la práctica clínica diaria.

3.2 Ganglio centinela

El concepto de ganglio centinela (GC) hace referencia al primer GL que recibe el drenaje linfático del tumor primario, basándose en la progresión organizada de las células tumorales hasta ese primer ganglio, lo que potencialmente le confiere mayor probabilidad de albergar células metastásicas. A diferencia de lo que ocurre en el cáncer de mama y en el melanoma, donde la afectación neoplásica del GC conlleva la necesidad de realizar una linfadenectomía, lo que constituye un procedimiento quirúrgico diferente al de la

resección del tumor primario, la principal utilidad de la identificación y evaluación histológica del GC en el CCR es la de mejorar la estadificación ganglionar, ya que la linfadenectomía generalmente forma parte del mismo procedimiento quirúrgico.

La técnica del GC en el CCR consiste en la inyección de un trazador, bien de forma preoperatoria mediante colonoscopia e inyección en la submucosa colónica, bien de forma intraoperatoria o *ex vivo*, en el servicio de Anatomía Patológica, mediante su inyección en la región peritumoral o en el espacio subseroso. Existen diversos protocolos que incluyen distintos trazadores, como pueden ser colorantes como el azul de metileno, radioisótopos o trazadores fluorescentes como el verde de indocianina, entre otros (110,111).

No obstante, la detección del GC presenta una sensibilidad de entre el 63% y el 73,3% para predecir el estado ganglionar en el CCR (112). Esta baja sensibilidad, a diferencia de lo que ocurre con el cáncer de mama o el melanoma, se debe a que el drenaje linfático colónico no sigue un patrón tan lineal, lo que explica la relativa frecuencia de *skip* metástasis o metástasis discontinuas, así como las metástasis en GLs fuera del territorio ganglionar locoregional, que podría deberse a alteraciones de linfangiogénesis o a oclusión linfática por el propio tumor (112). De hecho, se ha descrito que la sensibilidad de la técnica del GC está relacionada con el estadio pT del tumor, observando una sensibilidad del 80% en tumores pT1 o pT2, y del 30% en los pT3 y pT4 (110).

Pese a ello, se ha demostrado que la técnica del GC permite una mayor detección de GLs en total, así como de ganglios metastásicos (113) aunque se cuestiona la necesidad de realizar técnicas de ultraestadificación mediante realización de secciones seriadas e IHQ debido a que conlleva únicamente un

sobreestadiaje en el 1% de los casos y representa una importante sobrecarga de trabajo para el laboratorio y para el patólogo (114).

3.3 Técnicas moleculares

3.3.1 One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA)

La técnica molecular One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA; Sysmex Corporation, Kobe, Japón) es una técnica cuantitativa basada en el método RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification), una RT-PCR modificada para amplificar el ARNm de CK19 a partir de lisados de GLs (115). La detección de ARNm de CK19 mediante esta técnica presenta una sensibilidad de entre el 94.9–95.2% y una especificidad del 97.7–97.9% (116).

La técnica analiza el tejido ganglionar procesado en fresco, obteniendo un resultado cuantitativo en un periodo de tiempo de entre 17 y 45 minutos. La cantidad de ARNm de CK19 detectada es reportada en forma de número de copias/ μ l, habiéndose correlacionado los niveles de ARNm de CK19 con el tamaño de los focos tumorales metastásicos, tanto en cáncer de mama como en CCR, de modo que resultados de menos de 160 copias/ μ l se consideran ganglios negativos, entre 160 copias/ μ l y 250 copias/ μ l células tumorales aisladas, entre 250 copias/ μ l y 5.000 copias/ μ l se considera micrometástasis, y más de 5.000 copias/ μ l, macrometástasis (115).

3.3.1.1 Procedimiento

En la técnica de OSNA, los GLs se recogen en fresco, teniendo en cuenta que el rango de peso del analizador se encuentra entre 25 mg y 600 mg; de modo que aquellos ganglios que tengan un peso menor al límite inferior no podrán ser evaluados mediante la técnica OSNA y tendrán que ser evaluados mediante

técnicas histológicas convencionales, mientras que los ganglios mayores de 600 mg deberán ser seccionados y procesarse por separado, sumándose el resultado total de las distintas determinaciones para establecer el valor de la carga tumoral total (CTT), que representa el número total de copias/ μ l en las distintas determinaciones.

Los GLs seleccionados pueden congelarse a -80°C para su posterior análisis mediante OSNA, o pueden procesarse en fresco tras su disección. Para su análisis, primero se procede a obtener el lisado. Para ello, primero se han de homogeneizar las muestras con 4 ml del tampón de lisado Lynorhag, que estabiliza las moléculas de ARNm y protege contra la actividad de la ribonucleasa, minimizando el efecto de sustancias inhibidoras y precipita el ADN genómico. La homogeneización se lleva a cabo con un equipo RP-10 (Sysmex, Kobe, Japon) durante 90 segundos, y posteriormente se obtiene 1 ml del producto resultante que se centrifuga a 12.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente para eliminar los debris celulares. De la fase intermedia de este producto, que se encuentra entre la fase grasa y el pellet de los debris celulares, se pipetea 500 μ l en un tubo Eppendorf. De esta muestra se pipetearán 20 μ l para diluirlos a una concentración 1:10 con el tampón Lynorhag, constituyendo la muestra de análisis. Los 480 μ l restantes servirán como muestra de *back up*, que se congelará a -80°C y podrán servir para reanalizar la muestra en caso necesario. La muestra de análisis se introduce a continuación en el amplificador RD-210 (Sysmex, Kobe, Japón), con capacidad para el análisis de 14 muestras simultáneas. Es en este amplificador donde tendrán lugar las reacciones de amplificación isotérmica a 65°C del ARNm de CK19 utilizando el reactivo Lynoamp. Durante el proceso de esta reacción de amplificación se produce pirofosfato, que se une a un ion de magnesio dando lugar a pirofosfato de magnesio, que presenta una baja solubilidad en solución acuosa y precipita cuando

su concentración alcanza la saturación, lo que produce turbidez en el medio, detectada por la plataforma RD-210. Una vez que la turbidez alcanza un valor de densidad óptica de 0,1 a 465 nm se establece un umbral de tiempo, a partir del cual se determina la cantidad de copias de ARNm de CK19. La medición de la turbidez se realiza en tiempo real a intervalos de 6 segundos (115–117).

3.3.1.2. OSNA en cáncer de mama

La técnica de OSNA se aplicó por primera vez en el análisis intraoperatorio del GC en cáncer de mama en el año 2007 (115). En este mismo artículo, Tsujimoto et al. definieron los puntos de corte para la técnica OSNA para la distinción entre macrometástasis, micrometástasis y ausencia de metástasis; y demostraron su correlación con el análisis convencional histopatológico de los GLs, observando una tasa de concordancia global del 98,2% para todos los GLs evaluados, y del 96,4% para los GCs, mientras que no hubo ningún falso negativo.

Estudios posteriores han evaluado la capacidad de la técnica OSNA aplicada en GCs para predecir metástasis en GL no centinela (118,119), observando que una mayor CTT en los GC se asocia a una mayor frecuencia de metástasis en ganglios no centinela, lo que podría ayudar a la hora de la toma de decisiones sobre la necesidad de realizar una linfadenectomía axilar en pacientes con cáncer de mama (120).

En este mismo contexto, recientemente se ha explorado el papel de la detección molecular de metástasis ganglionar mediante OSNA en pacientes con cáncer de mama que han recibido terapia sistémica de forma neoadyuvante. Así, una CTT superior a 15.000 copias/ μ l en el GC ha demostrado ser un factor predictivo de metástasis en ganglios no centinela, con un valor predictivo negativo

(VPN) del 90,5%; mientras que una CTT superior a 25.000 copias/ μ l se relaciona con una peor supervivencia libre de enfermedad (121).

3.2.2.3 OSNA en cáncer de colon

La identificación del ARNm de CK19 como marcador óptimo para su evaluación mediante la técnica OSNA en CCR se describió en el 2013 por Yamamoto et al (116). Los autores estudiaron en una primera fase de cribado la expresión de 98 posibles marcadores de ARNm seleccionados a partir de bases de datos en GLs metastásicos y no metastásicos de CCR. De todos ellos, seleccionaron aquellos que presentaban una mayor diferencia de expresión entre los ganglios metastásicos y los no metastásicos, seleccionando 9 posibles candidatos que incluían ARNm de CEA, CK19, CK20, MUC2, MUC11, MUC12, MUC13, FXYD3 y CFTR. Finalmente observaron que, de todos ellos, los niveles de ARNm de CK19 se expresaba en todos los GLs metastásicos, siendo el marcador que presentaba una mayor sensibilidad (96,4%) y una especificidad del 100%; estableciendo un punto de corte para la distinción entre GLs metastásicos y no metastásicos en el rango entre 75-500 copias/ μ l. El punto de corte actual para definir como positivo un ganglio linfático se sitúa en 250 copias/ μ l, basándose en el punto intermedio logarítmico entre el valor máximo del número de copias de ARNm de CK19 en GLs de pacientes con CCR pN0 y -2 desviaciones estándar de la media del número de copias de ARNm de CK19 en GLs histológicamente positivos (122).

Con respecto a los diferentes estudios que han comparado la correlación entre la detección de metástasis ganglionar mediante OSNA y la evaluación histopatológica de los GLs, la metodología empleada para la evaluación histológica difiere. De esta manera, existen artículos donde diseccionan los GLs por la mitad, empleando una mitad del ganglio para la evaluación molecular mediante OSNA y

la mitad restante para la evaluación histológica convencional con un corte de 4 µm de grosor (123,124), mientras que otros autores realizan una única sección central del GL de 1 mm de grosor para su análisis histológico convencional, empleando el tejido restante para la evaluación por OSNA (125). Otros autores realizan secciones del GL en 4 partes iguales, utilizando dos secciones no consecutivas para la evaluación molecular, y las dos restantes para la evaluación histológica, incluyendo estudios adicionales con tinción IHQ para CK19 (126,127). En cualquier caso, independientemente de la metodología utilizada, se ha demostrado que el OSNA tiene un rendimiento similar a la evaluación histopatológica intensiva y superior a la evaluación estándar con H&E, con una sensibilidad, especificidad, concordancia, VPP y VPN del 90,4%, 96,8%, 96,0%, 79,8% y 98,6%, respectivamente (128).

Adicionalmente, la positividad por OSNA se ha relacionado con múltiples factores histológicos clásicos de alto riesgo en CCR, como son el tamaño tumoral, la presencia de ILV e IPN, alto grado histológico, un mayor estadio pT y un mayor estadio pN (123,129). En este sentido, Yamamoto et al. describieron también que la positividad por OSNA no solo se asocia a un mayor número de ganglios afectados, sino que el número de copias/µl aumenta a medida que incrementa el número de ganglios metastásicos, siendo la media 1550 copias/µl en estadios pN0 de, 24,050 copias/µl en tumores pN1 y 90,600 copias/µl en pN2 (123).

Otras potenciales aplicaciones de la evaluación mediante OSNA de los GLs en CCR incluye la predicción de metástasis ganglionares pélvicas laterales en pacientes con cáncer rectal avanzado. En este sentido, se ha sugerido que el análisis mediante OSNA de los GLs perirrectales podría ser útil a la hora de decidir qué pacientes podrían beneficiarse de una disección ganglionar pélvica, incluyendo aquellos pacientes que han realizado tratamiento neoadyuvante (130). El análisis

mediante OSNA del GC en CCR también ha demostrado reducir el tiempo de intervalo entre la cirugía y el inicio del tratamiento quimioterápico adyuvante en aquellos pacientes con presencia de metástasis ganglionar, al permitir colocar un dispositivo Port-a-Cath en el mismo acto quirúrgico (131).

Sin embargo, una de las limitaciones que presenta la evaluación por OSNA es el tamaño que presentan determinados GLs, ya que el límite inferior del rango de peso que presenta la técnica para la detección de ARNm de CK19 es de 25 mg. Rakislova et al. compararon la detección de metástasis ganglionar mediante OSNA en dos cohortes diferentes de CCR, una de ellas en la que los GLs fueron evaluados de forma individual, y otra cohorte donde estos se analizaron de forma conjunta, lo que denominaron el método *“pooling”*, consistente en analizar en un mismo tubo múltiples los GLs hasta llegar al límite de peso de 600 mg, sin observar diferencias significativas entre ambas cohortes. De esta manera, mediante el método *“pooling”*, aquellos GLs con un menor tamaño sí que pueden ser evaluados, reduciendo de forma significativa los costes asociados a la evaluación mediante OSNA, al disminuir el número de determinaciones a realizar, que resultaron ser de un máximo de 2 determinaciones por paciente, con una media de 18 GLs analizados en cada caso (132).

Hasta la fecha, pocos estudios han evaluado el impacto pronóstico de la positividad por OSNA en CCR. Itabashi et al. describieron recientemente en un estudio prospectivo y multicéntrico que el análisis ganglionar por OSNA en pacientes con CCR estadio II permitía sobre-estadificar el estado ganglionar hasta en un 15,7% de los casos, y que la positividad por OSNA era el único factor de riesgo que se asociaba en el análisis univariado a un mayor riesgo de recidiva a los 3 años tras la cirugía, mientras que no observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la supervivencia global, posiblemente debido a que

únicamente se realizó un seguimiento de 3 años a los pacientes (133). Sin embargo, otro estudio retrospectivo más reciente en 87 pacientes con CCR en estadio I, II y III no observó una correlación entre la positividad por OSNA y los análisis de supervivencia, incluyendo supervivencia específica de cáncer, supervivencia libre de recurrencia y supervivencia libre de enfermedad (134).

3.2.2.4 OSNA en otras neoplasias

La evaluación ganglionar por métodos moleculares como el OSNA ha sido investigada en muchos otros tipos de neoplasias diferentes del cáncer de mama y CCR. Entre ellas se incluyen neoplasias ginecológicas como el cáncer de cérvix y de endometrio (135,136), el cáncer gástrico (137), cáncer de tiroides (138), carcinomas escamosos de cabeza y cuello (139), cáncer de célula no pequeña pulmonar (140), y cáncer de próstata (141), entre otros. Distintos metaanálisis coinciden en que la evaluación por OSNA presenta una gran precisión, comparado con la evaluación histológica convencional, a la hora de detectar metástasis ganglionares (142,143).

HIPÓTESIS

El presente trabajo se basa en las siguientes hipótesis:

1. La carga tumoral total detectada mediante la técnica OSNA en ganglios linfáticos de cáncer colorrectal se correlaciona con otros factores de riesgo y puede tener valor pronóstico.
2. La mayor limitación hasta la fecha del análisis de los ganglios linfáticos en cáncer colorrectal con OSNA es la utilización de parte del ganglio linfático para la estadificación convencional con H&E y el resto para OSNA, por lo que se introduce un sesgo de localización del tumor, por lo que las cargas tumorales totales obtenidas mediante OSNA no son representativas de la totalidad del ganglio linfático.
3. La realización de extensiones citológicas de los ganglios linfáticos permitiría obtener el número de ganglios linfáticos positivos, o estadio pN convencional, siendo una alternativa a la evaluación histológica convencional con H&E, lo que permitiría a su vez analizar todo el ganglio linfático con OSNA.

OBJETIVOS

Objetivo general

El **objetivo general** de la presente tesis se basa en evaluar el impacto pronóstico del estadiaje molecular ganglionar mediante la determinación de la carga tumoral total ganglionar con la técnica OSNA en cáncer colorrectal, así como determinar la utilidad de la realización de extensiones citológicas como un método alternativo de estadificación ganglionar pN convencional.

Objetivos específicos:

1. Determinar el valor pronóstico de la carga tumoral total evaluada mediante la técnica OSNA en cáncer colorrectal. (Estudio 1)
2. Evaluar la correlación de la carga tumoral total con factores de alto riesgo en cáncer colorrectal. (Estudio 1)
3. Comparar la sensibilidad y especificidad de la realización de extensiones citológicas y del análisis ganglionar con la técnica OSNA con respecto a la evaluación histológica convencional para la estadificación ganglionar en cáncer colorrectal. (Estudio 2)
4. Evaluar el impacto pronóstico de los tres métodos de estadificación ganglionar: H&E, extensiones citológicas y OSNA. (Estudio 2)

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

Artículo 1:

Lymph Node Tumor Burden Correlates With Tumor Budding and Poorly Differentiated Clusters: A New Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma?

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., Balaguer, F., Castells, A., Camps, J., & Cuatrecasas, M.

Clin Transl Gastroenterol. 2021;12(3):e00303.

Resumen

La presencia de metástasis ganglionar es el factor pronóstico más importante en cáncer colorrectal (CCR), siendo la evaluación histológica de los ganglios linfáticos (GLs) el *gold standard* para el estadiaje ganglionar pN. No obstante, el estadiaje molecular ganglionar en CCR mediante OSNA ha demostrado ser más preciso que el estadiaje molecular histológico convencional, especialmente en estadios precoces. El objetivo del presente estudio multicéntrico prospectivo es evaluar la relación de la carga tumoral total (CTT) evaluada mediante la técnica OSNA en CCR con otros factores de riesgo convencionales, así como determinar su valor pronóstico.

Se obtuvieron 5.931 GLs de 342 pacientes con CCR en estadio I-III, que se analizaron mediante la técnica OSNA y análisis histológico convencional. La CTT de cada paciente se definió como la suma de todas las copias de ARNm de CK19/ μ L de todos los GLs evaluados.

La positividad molecular se correlacionó con la presencia de un mayor grado histológico, así como invasión perineural y linfovascular, invasión vascular extramural, un mayor estadio pT y estadio pN, y un alto grado de tumor *budding* y de *poorly differentiated clusters* ($p < 0.001$). Una CTT mayor o igual a 6.000 copias/ μ L se relacionó con una peor supervivencia global ($p = 0.046$) y supervivencia libre de enfermedad ($p < 0.001$).

Nuestros resultados muestran que el análisis molecular de los GLs en CCR se correlaciona con factores de alto riesgo en pacientes con CCR. Una CTT igual o mayor a 6.000 copias/ μ L se asocia a un peor pronóstico, por lo que el estadiaje molecular ganglionar podría ayudar a una mejor estratificación del riesgo de recidiva en estadios precoces.

Lymph Node Tumor Burden Correlates With Tumor Budding and Poorly Differentiated Clusters: A New Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma?

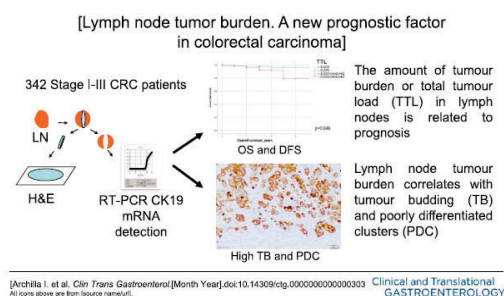
Ivan Archilla, MD¹, Sherley Díaz-Mercedes, MD¹, José Javier Aguirre, MD, PhD², Jordi Tarragona, MD, PhD³, Isidro Machado, MD, PhD⁴, Maria Teresa Rodrigo, MD¹, Sandra Lopez-Prades, MSc¹, Iñigo Gorostiaga, MD², Stefania Landolfi, MD⁵, Begoña Otero Alén, PhD⁶, Francesc Balaguer, MD, PhD^{7,8}, Antoni Castells, MD, PhD^{7,8}, Jordi Camps, PhD^{7,8} and Miriam Cuatrecasas, MD, PhD^{1,8}

INTRODUCTION: Molecular lymph node (LN) staging in early colorectal cancer (CRC) has demonstrated to be more precise than conventional histopathology pN staging. Tumor budding (TB) and poorly differentiated clusters (PDCs) are associated with LN metastases, recurrences, and lower survival in CRC. We evaluated the correlation between the total tumor load (TTL) in LNs from CRC surgical specimens with patient outcome, TB, and PDC.

METHODS: In this retrospective multicentre study, 5,931 LNs from 342 stage I–III CRC were analyzed by both hematoxylin and eosin and molecular detection of tumor cytokeratin 19 mRNA by one-step nucleic acid amplification. TB and PDC were evaluated by hematoxylin and eosin and cytokeratin 19 immunohistochemistry.

RESULTS: One-step nucleic acid was positive in 38.3% patients (n = 131). Tumor Budding was low in 45% cases, intermediate in 25%, and high in 30%. Poorly Differentiated Clusters were low-grade G1 in 53%, G2 in 32%, and G3 in 15%. TB and PDC correlated with TTL, high-grade, lymphovascular and perineural invasion, pT, pN and stage ($P < 0.001$). TB, PDC, and $TTL \geq 6,000$ copies/ μ L were associated with worse overall survival ($P = 0.002$, $P = 0.013$, and $P = 0.046$) and disease-free survival ($P < 0.001$).

DISCUSSION: The implementation of more sensitive molecular methods to assess LN status is a promising alternative approach to pN staging, which could be integrated to other factors to help risk stratification and management of patients with early-stage CRC. This study demonstrates the correlation of the amount of LN tumor burden with TB and PDCs. TTL is related to the outcome and could be used as a new prognostic factor in CRC (see Visual Abstract, Supplementary Digital Content 2, <http://links.lww.com/CTG/A512>).



¹Pathology Department, Center of Biomedical Diagnosis (CDB), Hospital Clínic, University of Barcelona, IDIBAPS, Spain; ²Pathology Department, Arava University Hospital, Vitoria-Gasteiz, Spain; ³Pathology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; ⁴Pathology Department, Instituto Valenciano de Oncología and Hospital QuirónSalud, Valencia, Spain; ⁵Department of Pathology, Hospital Universitario Torrecardenas, Almería, Spain; ⁶Pathology Department, Vall Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; ⁷Molecular Pathology Division, Pathology Department, CHUAC/INIBIC, A Coruña, Spain; ⁸Gastroenterology Department, Hospital Clínic, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ⁹Centro de Investigación Biomédica en Red. Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). ISCIII. Spain. **Correspondence:** Miriam Cuatrecasas, MD, PhD. E-mail: mcuatrec@clinic.cat.

Received May 15, 2020; accepted December 18, 2020; published online February 26, 2021

© 2021 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of The American College of Gastroenterology

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third carcinoma in incidence, with almost 1.8 million new cases in 2018, being the second cause of cancer-related death worldwide, accounting for 800,000 deaths in 2018 (1,2). CRC screening programs in average-risk population have achieved a significant mortality reduction because of an increased diagnosis at early stages of the disease (3). In addition, up to 70% CRC diagnosed in the context of screening programs are stages I–II, which could be cured after surgical excision. Nevertheless, 10%–15% of stage II patients recur within 5 years of curative-intended surgery (4,5). These stage II high-risk patients are difficult to identify with current strategies.

Lymph node (LN) status determines prognosis and the need of adjuvant therapy (6). In addition, the current pathology-based LN staging performed with the gold standard hematoxylin and eosin (H&E) does not guarantee a reliable pN0 because of its low sensitivity to detect LN micrometastases (7). A recent metanalysis showed that patients with LN micrometastases not detected by H&E had worse prognosis and impaired survival rates and would benefit from adjuvant therapy (7). Therefore, there is an unmet need for the incorporation of more sensitive methods of LN staging for early-stage CRC (5,7). In parallel, highly sensitive molecular methods have been recently incorporated into pathology diagnosis. New molecular techniques, such as the one-step nucleic acid assay (OSNA; Sysmex, Kobe, Japan), make it possible to detect the presence of LN tumor burden in 11.5%–50% of patients with CRC staged as pN0 by H&E (8–14). Therefore, molecular LN analysis could help to narrow down undetected patients with stage II CRC (8–10). Tumor burden in LNs is determined by the OSNA assay as the total tumor load (TTL), defined as the amount of tumor cytokeratin 19 (CK19) mRNA/μL copies present in LNs of CRC surgical specimens. We and other authors have recently demonstrated the correlation of the TTL with other CRC risk factors, such as pN, pT, tumor grade, male sex, tumor size and lymphovascular invasion (LVI), poor prognosis, and worse disease-free survival (DFS) (8–11,13,15,16).

Tumor budding (TB) and poorly differentiated clusters (PDCs) are morphologic manifestations of the epithelial-to-mesenchymal transition phenotype, a physiological process that allows epithelial cells to acquire mesenchymal properties and the potential for migration and stromal invasion, which is essential for developing metastases. TB is defined as the presence of single tumor cells or cell clusters formed by 4 cells or less at the tumor invasive front (17). PDCs consist of aggregates of at least 5 neoplastic cells in the tumor stroma that do not form glandular structures. Both TB and PDCs are independent prognostic factors in stage II colon cancer (17–22), associated with LN metastases, high pT stage, tumor grade, perineural invasion (PNI), LVI, extramural vascular invasion (EMVI), and distant metastases (22–28).

This study demonstrates the correlation of the TTL, a sensitive method to detect LN metastases, with patient outcome, TB, and PDC, considered risk factors for LN metastasis in early-stage CRC. The incorporation of molecular methods to assess LN status, together with other pathological risk factors, could help to improve risk stratification and management of patients with early-stage CRC.

METHODS

Study samples

This is a retrospective multicenter observational study from 3 hospitals, which includes all patients with stage I–III CRC who underwent LN analysis with both the OSNA assay and H&E between 2010 and 2018. Inclusion criteria were patients older than 18 years old with histologically confirmed primary CRC and positive CK19 immunoreaction. Exclusion criteria included synchronous CRC or presence of other malignant neoplasms, metastatic disease, neoadjuvant therapy, familial adenomatous polyposis, carcinomas on inflammatory bowel disease, and the presence of intraluminal stent-type devices. The study was presented and approved by the Scientific and Ethics Committee of each institution.

Study procedure

Fresh LN dissection and sample processing. All freshly dissected LNs from the mesocolon or mesorectal fat were analyzed by 2 methods, H&E and OSNA, as previously described (8,9). Briefly, all LNs were sectioned, submitting part of the LN for conventional formalin-fixation, paraffin-embedding, and H&E staining. The rest of the LN was put into PCR tubes and stored at -80°C until OSNA analysis was performed. After fresh LN procurement, the fat was fixed in 10% neutral buffered formalin, and a second-look dissection was performed for remaining LNs, which were processed only by conventional histopathological analysis (8,9).

OSNA assay. The OSNA assay is a standardized, quantitative, objective, and reproducible method of evaluation based on a type of QRT-PCR called reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP), which amplifies CK19 mRNA. It has been validated for LN analysis of breast and CRC. The OSNA assay was performed at each institution using the protocol described by Tsujimoto et al. (29) and following the manufacturer's instructions. Briefly, each PCR tube containing LNs was homogenized with the lysis buffer Lynorhag (Sysmex, Hyogo, Japan) for mRNA stabilization and genomic DNA precipitation, centrifuged and amplified using the RT-LAMP method with the RD-100i automated gene-amplification system (Sysmex). As a result, the number of tumor CK19 mRNA copies/μL present in all LNs of the surgical specimen, defined as the TTL, was obtained. An OSNA result of ≥ 250 copies/μL was considered positive, as established and validated in previous studies (11,12).

Pathology report and LN staging. Pathology reports including LN staging were performed based on H&E analysis according to the AJCC/UICC TNM, 8th edition (30). Both pathologists and clinicians were blinded to the OSNA results.

TB and PDC assessment. Histopathological H&E-stained slides were reviewed by a pathology fellow and a gastrointestinal pathologist (I.A., and M.C.). Discordant cases were revisited together and a consensus about the definite score was reached. All slides containing tumor were first scanned at low-power magnification to identify the area with the highest density of TB and PDCs on H&E. Then, the selected slide or slides were immunostained with CK19.

Table 1. Demographic, clinical, and pathological characteristics

Gender	
Male	207 (60.5%)
Female	135 (39.5%)
Age (yr, mean $\pm$ SD)	68.8 $\pm$ 11.5
Tumor location	
Right colon	115 (33.6%)
Transverse colon	45 (13.2%)
Left colon	130 (38%)
Rectosigmoid colon	36 (10.5%)
Rectum	16 (4.7%)
Tumor size (cm, mean $\pm$ SD)	3.3 $\pm$ 1.8
Macroscopic configuration	
Polypoid	174 (50.9%)
Ulcerated	168 (49.1%)
Grade	
Low	189 (55.3%)
High	153 (44.7%)
Invasive front	
Pushing border	165 (55.2%)
Infiltrative margin	101 (33.8%)
Mixed	33 (11%)
PNI	
Absent	298 (87.1%)
Present	44 (12.9%)
LVI	
Absent	246 (71.9%)
Present	96 (28.1%)
EMVI	
Absent	324 (94.7%)
Present	18 (5.3%)
pT stage	
pT1	66 (19.3%)
pT2	85 (24.8%)
pT3	148 (43.3%)
pT4a	42 (12.3%)
pT4b	1 (0.3%)
pN stage	
pN0	269 (78.7%)
pN1a	32 (9.4%)
pN1b	24 (7%)
pN2a	8 (2.3%)
pN2b	7 (2%)
pN1c	2 (0.6%)

Table 1. (continued)

Stage	
I	139 (40.7%)
II	130 (38%)
III	73 (21.3%)

EMVI, extramural vascular invasion; LVI, lymphovascular invasion; PNI, perineural invasion.

The number of TB was evaluated at the invasive front of the tumor corresponding to the hotspot area of the selected region. TB was counted on one field of 0.785 mm² using a 20 $\times$ objective lens and normalized according to the International Consortium on TB Recommendations (17). TB was graded as Bd1/low (0–4 buds), Bd2/intermediate (5–9 buds) and Bd3/high ($\geq$ 10 buds). PDCs were evaluated at 20 $\times$ either at the invasive front or the center of the tumor and graded as G1 (0–4 clusters), G2 (5–9 clusters), and G3 ($\geq$ 10 clusters) (31). In mucinous carcinomas, tumor cells within mucin pools were not classified as TB, only considering tumor cells infiltrating the stroma with minimal extracellular mucin. Contrarily, PDCs were evaluated within mucin lakes, as proposed by Barresi et al. (32).

CK19 immunohistochemistry. Immunohistochemistry (IHC) stainings were performed to all primary CRC using the CK19 antibody (A53-B/A2, 760–4,281, Roche). IHC was performed on consecutive sections of the tumor where TB and PDC were assessed with 2 purposes: first, to enable the comparison of TB and PDC counts with H&E and IHC and second, to assess the positivity of the tumor for CK19 and ensure reliable negative molecular CK19 mRNA OSNA results. Positive immunostaining was defined as $\geq$ 10% membranous staining with or without cytoplasm staining of tumor cells.

Statistical analysis

Clinicopathological characteristics collected for each patient were reviewed, and cases with incomplete data were excluded. The statistical analysis was performed in accordance with the study protocol. The primary endpoint was the concordance between TTL with TB, PDC, and patient outcome. Secondary endpoints were the correlations of TTL with TB and PDC assessed by H&E or IHC and the correlation of TB and PDCs with other clinicopathological factors. The χ^2 test, Fisher exact test, and Spearman correlation coefficient were used for testing the association between categorical or numerical variables, respectively. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare group distributions. A $P < 0.05$ was considered statistically significant. A Kaplan–Meier survival analysis with logrank tests was performed for the variables TB, PDC, and TTL. A multivariate logistic regression analysis was used to predict the TTL outcome (cutoff point = 6,000 copies/ μ L) including the following variables: TB, LVI, PNI, pT, tumor size, gross tumor configuration, histological grade, and peripheral growth pattern. All analyses were performed using SPSS v25 statistician package (IMB, Chicago, IL).

RESULTS

Patients and pathological data

The study included 429 stages I–III CRC with LN analysis by OSNA and H&E. Forty-nine patients with incomplete data and 37 *in situ* carcinomas and one case with synchronous carcinomas were excluded. Finally, the study was performed on 342 patients recruited in 3 hospitals between June 2012 and July 2018. Seventy-three patients (21.3%) had LN metastasis on H&E examination, of which only 14 cases (19.18%) were diagnosed as cN positive by preoperative computed tomography. The patient's follow-up was between 40 days and 6.5 years. Demographic, clinical, and pathological characteristics are summarized in Table 1.

LN dissection

A total of 6,785 LNs were dissected, with a mean of 19 LNs per case. Of those, 5,931 LNs (87.5%) were freshly dissected (17 LNs per case) and analyzed by both H&E and OSNA and 854 (12.5%) LNs were procured on a second look after formalin fixation and analyzed by H&E. A weak positive correlation between the number of fresh LNs sampled and the amount of TTL was observed ($r = 0.12$, $P = 0.027$), showing no differences between the amount of LNs between OSNA negative patients (16.7 LNs/case) and OSNA positive cases (18.4 LNs/case) ($P = 0.089$).

TB and PDC assessment by H&E and IHC

All primary tumors included in the study were positive for CK19 IHC. TB distribution assessed on H&E was: 204 (59.6%) Bd1, 79 (23.1%) Bd2, and 59 (17.3%) Bd3. TB distribution performed on IHC was as follows: 154 (45%) Bd1, 85 (25%) Bd2, and 103 (30%) Bd3. Regarding PDCs, assessment with H&E resulted in 207 (60.5%) G1, 94 (27.5%) G2, and 41 (12%) G3, whereas assessment by IHC resulted in 180 (53%) G1, 111 (32%) G2, and 51 (15%) G3. Cases were similarly distributed with both methods of evaluation, with a strong correlation between H&E and CK19 IHC, being higher for PDC assessment than for TB ($r = 0.879$, $P < 0.001$ for PDC and $r = 0.76$, $P < 0.001$ for TB). When the evaluation was performed with IHC, more TB cases were classified as Bd3 and to a much lesser extent as G3-PDC (Table 2).

TTL positivity correlates with TB and PDC

OSNA positivity was found in 38.3% of the cases (131/342) with a mean TTL of 36,662 copies/ μ L among positive cases. We observed a positive correlation between the amount of tumor burden present in the LNs (TTL) assessed by the OSNA assay, with both TB ($r = 0.249$ by IHC; $r = 0.243$ by H&E) and PDC ($r = 0.266$ by IHC; $r = 0.257$ by H&E) ($P < 0.001$). In mucinous carcinomas ($n = 34$), we observed a trend between PDC grades within mucin pools and TTL, although it was not statistically significant (TTL in G1 = 127 copies/ μ L; G2 = 921 copies/ μ L; G3 = 10,714 copies/ μ L; $P = 0.26$).

The mean TTL was similar for low and intermediate TB (Bd1: 3,292 copies/ μ L and Bd2: 18,002 copies/ μ L), with no significant differences between both groups ($P = 0.154$). The mean TTL of high-Bd3 TB was 45,331 copies/ μ L, with significant differences with Bd1 and Bd2. Similarly, there were no significant differences when comparing the mean TTL of PDC G1, with 4,962 copies/ μ L and G2, with 13,146 copies/ μ L ($P = 0.068$), although PDC G3 had 61,108 copies/ μ L, with significant differences between low and intermediate grades. Thus, we grouped low and intermediate grades of TB and PDC into one category, obtaining 2 groups with significant differences for both TB and PDC ($P < 0.001$) as well (Figure 1).

Correlation of TB, PDCs, and TTL with other histopathologic features

TB and PDC were highly correlated among them when the evaluation was performed with either IHC and H&E, being higher for IHC ($r = 0.69$; $P < 0.001$ by H&E and $r = 0.773$; $P < 0.001$ by IHC). TB and PDCs were both significantly associated with each other ($P < 0.001$) and with LVI, PNI, EMVI, infiltrative type of invasion at the invasive front, ulcerative gross configuration, pT, pN, and stage ($P < 0.001$). Regarding the WHO grade, TB did not show a significant association ($P = 0.054$), whereas PDCs were associated with grade ($P < 0.001$). We did not find any association for TB and PDC with tumor location, age, sex, nor size of the tumor (Table 3). A similar analysis was conducted concerning TTL, showing that it was also associated to a higher tumor grade, infiltrative type of tumor invasion, LVI, PNI, EMVI, pT, pN, and stage ($P < 0.001$), whereas it was not related to sex, age, tumor location, size of the tumor, nor macroscopic configuration.

Table 2. Correlation between TB and PDCs grades assessed by H&E and CK19 IHC

CK19 IHC	Bd1 (n = 154, 45%)	Bd2 (n = 85, 25%)	Bd3 (n = 103, 30%)	Rho spearman	P value
H&E staining					
Bd1 (n = 204, 59.6%)	148	43	13	0.76	0.001
Bd2 (n = 79, 23.1%)	6	40	33		
Bd3 (n = 59, 17.3%)	0	2	57		
CK19 IHC	PDC G1 (n = 180, 52.6%)	PDC G2 (n = 111, 32.5%)	PDC G3 (n = 51, 14.9%)	Rho spearman	P value
H&E staining					
PDC G1 (n = 207, 60.5%)	179	28	0	0.879	0.001
PDC G2 (n = 94, 27.5%)	1	81	12		
PDC G3 (n = 41, 12%)	0	2	39		

Bd1, Bd1, Bd2, and Bd3, budding 1, 2, and 3; CK19, cytokeratin 19; H&E, hematoxylin and eosin; IHC, immunohistochemistry; PDC, poorly differentiated cluster; PDC G1, PDC G2, and PDC G3, grades 1, 2, and 3; PNI, perineural invasion; TB, tumor budding.

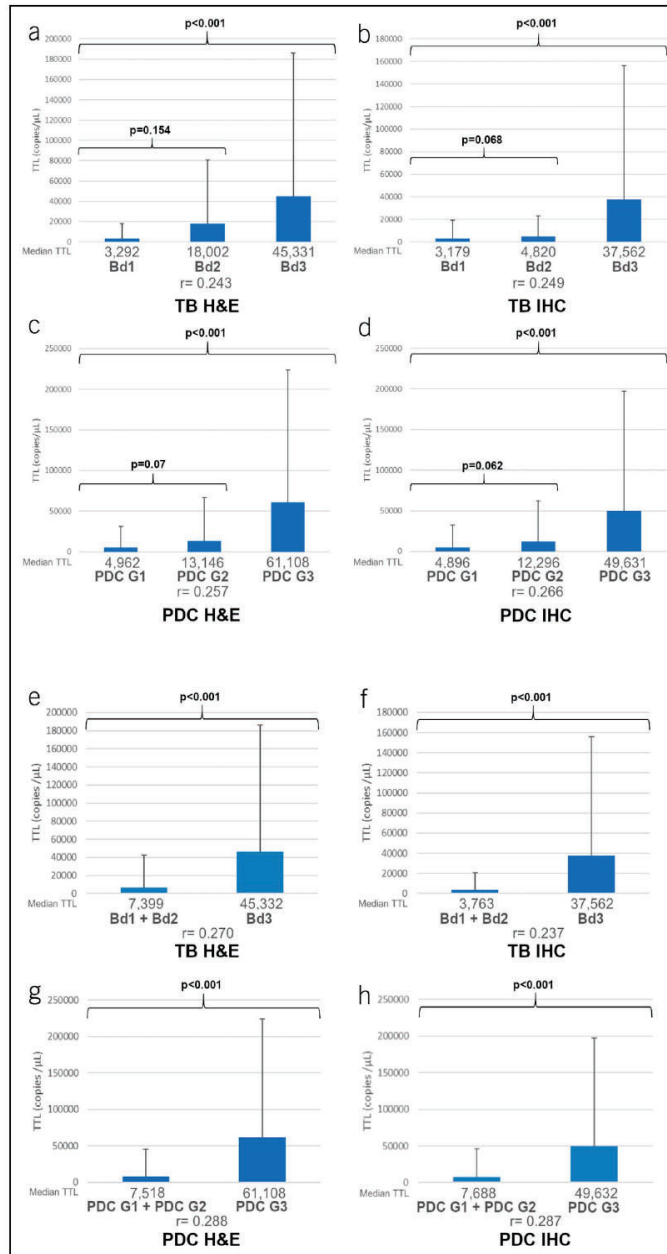


Figure 1. Correlation between TB and PDCs with TTL: (a) Correlation between TTL with Bd1, Bd2, and Bd3 TB by H&E and; (b) by IHC; (c) correlation between TTL with PDC G1, G2, and G3 by H&E; (d) and by IHC. (e) Correlation between TTL with 2-tier TB grading by H&E and (f) IHC. Correlation of TTL with 2-tier PDC (g) by H&E; (h) and IHC. H&E, haematoxylin and eosin; IHC, immunohistochemistry; PDC, poorly differentiated cluster; TB, tumor budding; TTL, total tumor load.

Regarding CRC stages, most stage I cases had low-Bd1 TB (76.3%, n = 190), low-grade G1 PDC (77.7%, n = 108), and lower TTL, with a mean of 294 copies/μL compared with stage II: 3,358

copies/μL and stage III cases: 58,781 copies/μL ($P < 0.001$), being also significant when comparing stage II and stage III ($P < 0.001$). Similarly, the TTL progressively increased with pT and pN stages,

Table 3. Correlation of TB and PDCs with histopathological features

	TB H&E			P value	PDC H&E			P value
	Bd1	Bd2	Bd3		PDC G1	PDC G2	PDC G3	
Gender				0.4491				0.2201
Male	127 (61.3%)	43 (20.8%)	37 (17.9%)		132 (63.8%)	50 (24.2%)	25 (12.1%)	
Female	77 (57%)	36 (26.7%)	22 (16.3%)		75 (55.6%)	44 (32.6%)	16 (11.9%)	
Age (yr, mean $\pm$ SD)	67.9 $\pm$ 10.9	69.5 $\pm$ 11.5	72 $\pm$ 13	0.182	68.4 $\pm$ 11.1	69.1 $\pm$ 11.9	71.4 $\pm$ 12.5	0.1962
Tumor location				0.3161				0.2691
Right colon	68 (59.1%)	28 (24.3%)	19 (16.5%)		63 (54.8%)	38 (33%)	14 (12.2%)	
Transverse colon	25 (55.6%)	8 (17.8%)	12 (26.7%)		23 (51.1%)	17 (37.8%)	5 (11.1%)	
Left colon	82 (63.1%)	25 (19.2%)	24 (17.7%)		90 (69.2%)	25 (19.2%)	15 (11.5%)	
Rectosigmoid colon	20 (55.6%)	13 (36.1%)	3 (8.3%)		22 (61.1%)	10 (27.8%)	4 (11.1%)	
Rectum	9 (56.3%)	5 (31.3%)	2 (12.5%)		9 (56.3%)	4 (25%)	3 (18.8%)	
Tumor size (cm. Mean $\pm$ SD)	3.3 $\pm$ 2	3.4 $\pm$ 1.8	3.6 $\pm$ 1.7	0.4332	3.3 $\pm$ 2	3.5 $\pm$ 1.7	3.7 $\pm$ 1.7	0.1232
Macroscopic configuration				0.0001				0.002
Polypoid	126 (72.4%)	31 (17.8%)	17 (9.8%)		120 (69%)	41 (23.5%)	13 (7.5%)	
Ulcerated	78 (46.4%)	48 (28.6%)	42 (25%)		87 (51.8%)	53 (31.5%)	28 (16.7%)	
Grade				0.054				0.0001
Low	122 (64.6%)	42 (22.2%)	25 (13.2%)		133 (70.4%)	39 (20.6%)	17 (9%)	
High	82 (53.6%)	37 (24.2%)	34 (22.2%)		74 (48.4%)	55 (35.9%)	24 (15.7%)	
Invasive front				0.0001				0.0001
Pushing border	139 (84.2%)	12 (11.5%)	7 (4.2%)		130 (78.8%)	30 (18.2%)	5 (3%)	
Infiltrative margin	33 (32.7%)	30 (29.7%)	38 (37.6%)		38 (37.6%)	35 (34.7%)	28 (27.7%)	
Mixed	15 (45.5%)	12 (36.4%)	6 (18.2%)		17 (51.5%)	11 (33.3%)	5 (15.2%)	
PNI				0.0001				0.0001
Absent	124 (65.1%)	69 (23.2%)	35 (11.7%)		193 (64.8%)	81 (27.2%)	24 (8.1%)	
Present	10 (22.7%)	10 (22.7%)	24 (54.5%)		14 (31.8%)	13 (29.5%)	17 (38.6%)	
LVI				0.0001				0.0001
Absent	168 (68.3%)	57 (23.2%)	21 (8.5%)		173 (70.3%)	61 (24.8%)	12 (4.9%)	
Present	36 (37.5%)	22 (22.9%)	38 (39.6%)		34 (35.4%)	33 (34.4%)	29 (30.2%)	
EMVI				0.0001				0.0001
Absent	200 (61.7%)	74 (22.8%)	50 (15.4%)		204 (63%)	87 (26.9%)	33 (10.2%)	
Present	4 (22.2%)	5 (27.8%)	9 (50%)		3 (16.7%)	7 (38.9%)	8 (44.4%)	
pT stage				0.0001				0.0001
pT1	59 (89.4%)	4 (6.1%)	3 (4.5%)		57 (86.4%)	7 (10.6%)	2 (3%)	
pT2	54 (63.5%)	23 (27.1%)	8 (9.4%)		57 (67.1%)	23 (27.1%)	5 (5.9%)	
pT3	76 (51.4%)	44 (29.7%)	28 (18.9%)		82 (55.4%)	47 (31.8%)	19 (12.8%)	
pT4a	15 (35.7%)	8 (19%)	19 (45.2%)		11 (26.2%)	17 (40.5%)	14 (33.3%)	
pT4b	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)		0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
pN stage				0.0001				0.0001
pN0	180 (66.9%)	61 (22.7%)	28 (10.4%)		183 (68%)	69 (25.7%)	17 (6.3%)	
pN1a	15 (46.9%)	5 (15.6%)	12 (37.5%)		14 (43.8%)	10 (31.3%)	8 (25%)	
pN1b	5 (21.7%)	8 (34.8%)	10 (43.5%)		6 (26.1%)	7 (30.4%)	10 (43.5%)	
pN2a	1 (14.3%)	2 (28.6%)	4 (57.1%)		0 (0%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)	
pN2b	2 (28.6%)	1 (14.3%)	4 (57.1%)		2 (28.6%)	3 (42.9%)	2 (28.6%)	

Table 3. (continued)

	TB H&E			P value	PDC H&E			P value
	Bd1	Bd2	Bd3		PDC G1	PDC G2	PDC G3	
pN1c	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)		1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	
Stage				0.0001				0.0001
I	106 (76.3%)	22 (15.8%)	11 (7.9%)		108 (77.7%)	25 (18%)	6 (4.3%)	
II	74 (56.9%)	39 (30%)	17 (13.1%)		75 (57.7%)	44 (33.8%)	11 (8.5%)	
III	24 (32.9%)	18 (24.6%)	31 (42.5%)		24 (32.9%)	25 (34.2%)	24 (32.9%)	
TTL (Copies/ μ L)	3,292 $\pm$	18,002 $\pm$	45,331 $\pm$	0.0002	4,962 $\pm$	13,146 $\pm$	61,108 $\pm$	0.0002
Mean $\pm$ SD)	14,543	62,747	140,709		26,527	53,823	162,682	

Bd1, Bd2, and Bd3, budding 1, 2, and 3; EMVI, extramural vascular invasion; H&E, hematoxylin and eosin; LVI, lymphovascular invasion; PDC, poorly differentiated cluster; PDC G1, PDC G2, and PDC G3, grades 1, 2, and 3; PNI, perineural invasion; TB, tumor budding; TTL, total tumor load. Numbers in bold highlight significant *P* values.

with 750 copies/ μ L in pT1, 2,622 copies/ μ L in pT2, 24,797 copies/ μ L in pT3, and 19,131 copies/ μ L in pT4. As for pN, a mean of 1,775 copies/ μ L was found in pN0, 49,413 copies/ μ L in pN1 and 95,000 copies/ μ L in pN2 cases ($P < 0.001$), with a trend but no statistical differences between pN1 and pN2 ($P = 0.27$). The logistic regression analysis showed the variables LVI ($P < 0.001$) and T stage ($P = 0.016$) as the only predictive factors of TTL $\geq 6,000$ copies/ μ L.

Survival analysis

Kaplan-Meier survival analysis using the logrank test among all cases was performed, which showed that TB, PDC, and TTL were significantly associated with overall survival ($P = 0.002$; $P = 0.013$

and $P = 0.046$, respectively) (Figure 2) and DFS ($P < 0.001$). When the survival analysis was conducted in stage I and II patients, only PDC ($P = 0.026$), but not TB nor TTL, was associated with DFS (see Supplemental Figure, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CTG/A511>, which shows DFS curves in stage I and II cases).

DISCUSSION

Pathological H&E assessment is the gold standard for the evaluation of the LN status or pN staging. Nevertheless, its interpretation is rather subjective and it yields some false negative results, mainly because of tumor allocation bias within LNs

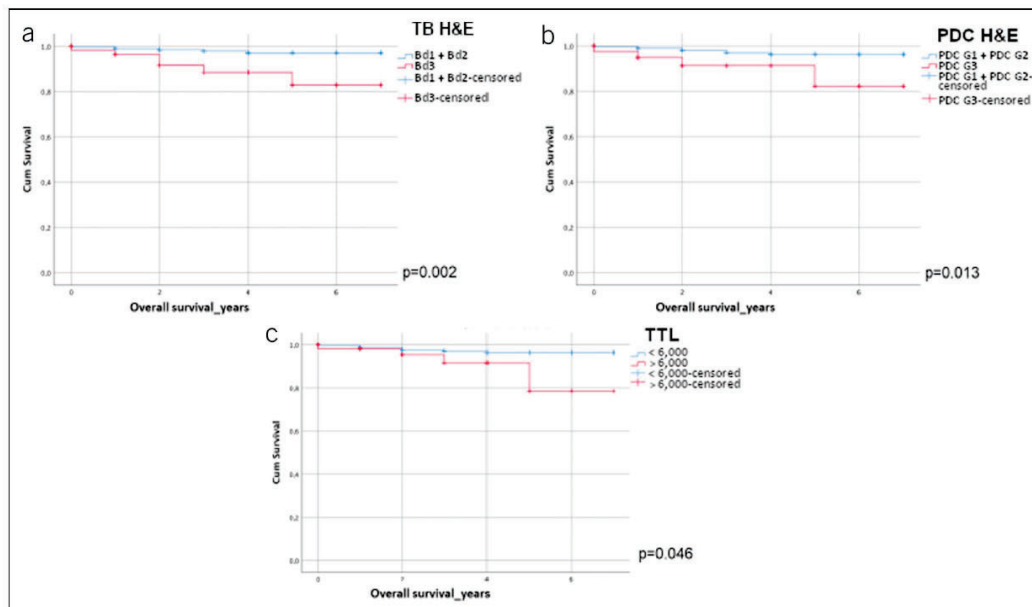


Figure 2. OS curves showing (a) worse OS for patients with Bd3 than for patients with Bd1 or Bd2, (b) worse OS for patients with PDC G3 than for patients with PDC G1 or PDC G2, (c) worse OS for patients with TTL $\geq 6,000$ copies/ μ L. Cum survival, cumulative survival; H&E, hematoxylin and eosin; OS, overall survival; PDC, poorly differentiated cluster; TB, tumor budding; TTL, total tumor load.

(7,8,15). In fact, up to 15% of patients with histological stage II CRC recur within 5 years after curative-intended surgery (4,5). Moreover, there is evidence that molecular detection of LN micrometastases in stage II CRC is associated with a higher risk of recurrence, worse prognosis, and lower survival rates (7,9,16). We aimed at demonstrating the importance of the incorporation of LN molecular staging in the diagnosis and LN staging of CRC by demonstrating its correlation with patient outcome, TB, and PDC as factors related to LN metastasis and prognosis.

The OSNA assay is a molecular method for the detection of tumor CK19 mRNA within the LNs. It is quantitative and objective, providing data on the amount of tumor burden present in the LNs. Its sensitivity and specificity in CRC have been reported to be 86.2% and 96.5%, respectively, with a concordance rate between H&E slides and the OSNA results of 96.5% (11). It is a feasible method which makes it possible to reduce interobserver variability and being used in routine diagnosis for molecular LN staging. We believe that it could be an alternative tool to H&E pN staging in the setting of early-stage CRC (8,11,15,33). We and other authors have previously reported the correlation of OSNA positiveness with clinicopathologic risk factors such as male sex, pT, pN, high histological grade, mucinous/signet ring histological types, and tumor size (8,9,11).

We analyzed 5,931 LNs from 342 stage I–III CRC using the OSNA assay. We have shown that a TTL $\geq 6,000$ copies/ μ L is associated to worse DFS and overall survival, and it is also correlated with TB and PDCs, being both factors related to outcome in CRC, implying that TTL could be used as an additional risk factor in patients with CRC. Besides, the correlation of TTL with other clinical and pathological CRC risk factors is further demonstrated here with additional factors such as stage and LVI. Nevertheless, when the survival analysis was conducted among stages I and II, only PDC, but not TB nor TTL, was associated to DFS, which could be explained because of the low number of recurrent early stages in our cohort (15/269) and to the low frequency of recurrences among stage I CRC. Therefore, stage II patients with TTL $\geq 6,000$ copies/ μ L could be individually assessed for therapeutic decision with all other risk factors taken together. TB and PDC are both manifestations of the epithelial-to-mesenchymal transition process, which have been widely reported to have a strong relationship with LN metastasis and are prognostic factors in CRC (17,21–26,34–38). LN involvement is a crucial prognostic factor in patients with early-stage CRC, and the most significant predictor of 5-year cancer specific and DFS (7,15,16,39); thus, it should be a priority to know the amount of tumor present in the LN compartment. In fact, the TTL quantifies the amount of tumor cells or tumor burden present in the LNs of a given patient, which has been proven in breast cancer to be a better prognostic predictor, and reflects better the aggressiveness of the tumor than the number of positive axillary LNs (40–42).

We evaluated TB and PDC with both H&E and IHC. We observed that more cases were classified as high-Bd3 TB when TB analysis was performed with IHC, suggesting that IHC could be more useful for risk stratification. Although the international consortium on TB recommends evaluating TB on H&E stained slides, and it may seem obvious that the use of IHC for TB assessment reduces subjectivity and enhances quantification, a recent study has shown that IHC is not especially helpful in the assessment of individual TB and also facilitates the visualization of TB mimickers, which may impact on the budding count (43,44).

Regarding LN tumor burden, we found similar TTL values in cases with Bd1 or Bd2 TB, and there were no differences among TTL values for PDC G1 and G2, suggesting that intermediate TB and PDC G2 may behave as low grade with respect to the amount of tumor present in the LNs. Therefore, in predicting the risk of LN metastasis related to the grade of both TB and PDC, a dichotomous system of evaluation (low grade vs high grade) might be more accurate in the clinical setting of early-stage CRC, than using a three-tier system. This observation endorses other authors' observations that have also suggested to better stratify patients' risk, by combining TB and PDC grades into a dual grading system (high-grade: Bd3+G2/G3, Bd2+G3; low-grade: other combinations) (22,45). Regarding stage, our results are encouraging because the TTL shows differences between stage II and III, which reflects the clinical implication of its value regarding CRC management. Taken together, the TTL could be used as an alternative method to H&E pN staging to better stage patients because it is able to identify real stage II or III patients; thus, selecting those who are candidates for adjuvant therapy.

In agreement with previous reports, we did not find any correlation between WHO grade and TB, whereas both PDCs and TTL showed an association with the WHO grade. In fact, it has been shown that PDCs is a better prognostic factor, having a higher reproducibility and correlation with patient outcome than the conventional WHO grading system (27,28,31,35). A possible explanation is the fact that the WHO grade is based on the degree of tumor differentiation and the proportion of gland formation by the tumor, which is a method with low interobserver concordance (27,28,31,32). The evidence that the PDC grading system successfully stratifies patients with CRC by survival outcome may generate some doubts on the value of the WHO grading system in this type of tumor. Our results suggest that TB and PDCs may reflect different features of the tumor; although TB might be more closely related to LN metastasis, PDCs may better reflect the grade and aggressiveness of the tumor.

To our knowledge, this is the largest OSNA study on CRC, and our results are aligned with those observed in previous publications. One limitation of all OSNA studies performed in CRC, including ours, is that the analysis has been performed using only a part of the LNs while using the rest of the LN tissue for conventional histological analysis and pN staging. Despite that, our results are very promising and have demonstrated good correlations with many CRC risk factors and patient outcome as a new prognostic value. As it is performed in breast cancer sentinel LNs, complete molecular LN analysis should be performed in CRC to be able to establish more accurate TTL values.

To conclude, the implementation of more sensitive molecular methods of LN staging makes it possible to better detect and quantify the amount of tumor burden present in regional LNs. The combination of the TTL as a new prognostic factor, together with other clinicopathologic risk factors such as TB and PDC, could help to better stratify and manage patients with early-stage CRC at risk of recurrence.

CONFLICTS OF INTEREST

Guarantor of the article: Miriam Cuatrecasas, MD, PhD.

Specific author contributions: Conceptualization: I.A., M.C.; Data curation: I.A., M.C., S.D., and S.L.; Formal analysis: J.J.A.; Funding acquisition: M.C., F.B., A.C., and J.C.; Writing – original draft: I.A. and M.C.; Writing – review and editing: All authors. All authors have approved the final draft submitted.

Financial support: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (grants PI17/01304 to J.C and M.C.; grant PI16/00766

to F.B., and a Miguel Servet grant to J.C., cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF) (CPII18/00026), through the Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación, and Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2017SGR653 and 2017SGR1035). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III. We also acknowledge the support of the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya, and the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC).

Potential competing interests: None to report.

Study Highlights

WHAT IS KNOWN

- ✓ Molecular lymph node (LN) staging in colorectal cancer (CRC) is more sensitive than conventional pathology pN staging.
- ✓ Tumor budding (TB) and poorly differentiated clusters (PDCs) are prognostic factors in CRC.
- ✓ LN tumor burden has proven to be risk factor in CRC.

WHAT IS NEW HERE

- ✓ LN tumor burden is correlated with TB and PDCs and is related to prognosis.

TRANSLATIONAL IMPACT

- ✓ The implementation of molecular LN staging will allow to use LN tumor burden as a new prognostic factor, which would improve CRC patients' staging and management.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Mireia Aragay for English editing.

REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. 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. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2018;144(8):i19–i38.
3. Valori R, Sint Nicolaas J, De Jonge V. Quality assurance of endoscopy in colorectal cancer screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;24(4):451–64.
4. Shah MA, Renfro LA, Alberts SR, 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;34:843–53. doi:10.1200/JCO.2015.63.0558.
5. Pahlman LA, Hohenberger WM, Matzel K, et al. Should the benefit of adjuvant chemotherapy in colon cancer be re-evaluated? *J Clin Oncol* 2016;34(12):1297–9.
6. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, et al. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol* 2010;28(2):264–71.
7. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, 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* 2012;30(1):60–70.
8. Aldecoa I, Atares B, Tarragona J, 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):385–394. doi:10.1007/s00428-016-1990-1.
9. Rakislova N, Montironi C, Aldecoa I, 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. doi:10.1186/s12967-016-1114-3.
10. Croner RS, Geppert CI, Bader FG, 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.
11. Yamamoto H, Tomita N, Inomata M, et al. OSNA-assisted molecular staging in colorectal cancer: A prospective multicenter trial in Japan. *Ann Surg Oncol* 2016;23(2):391–6.
12. Yamamoto H, Sekimoto M, Oya 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(7):1891–8.
13. Güller U, Zettl A, Worn M, et al. 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(24):6039–45.
14. Aldecoa I, Montironi C, Planell N, et al. Endoscopic tattooing of early colon carcinoma enhances detection of lymph nodes most prone to harbor tumor burden. *Surg Endosc* 2017;31(2):723–733.
15. Yamamoto H, Murata K, Fukunaga M, et al. Micrometastasis volume in lymph nodes determines disease recurrence rate of stage II colorectal cancer: A prospective multicenter trial. *Clin Cancer Res* 2016;22:3201–8.
16. Itabashi M, Yamamoto H, Tomita N, 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;27:1077–83.
17. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol* 2017;30(9):1299–311.
18. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: Tumor budding as oncotarget. *Oncotarget* 2010;1(7):651–61.
19. De Smedt L, Palmans S, Andel D, et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *Br J Cancer* 2017;116(1):58–65.
20. Barresi V, Branca G, Vitarelli E, et al. Micropapillary pattern and poorly differentiated clusters represent the same biological phenomenon in colorectal cancer: A proposal for a change in terminology. *Am J Clin Pathol* 2014;142(3):375–83.
21. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer—Ready for diagnostic practice? *Hum Pathol* 2016;47(1):4–19.
22. Lee VWK, Chan KF. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in stage II colon cancer. *Pathol Res Pract* 2018;214(3):402–7.
23. Ryan É, Khaw YL, Creavin B, et al. Tumor budding and PDC grade are stage independent predictors of clinical outcome in mismatch repair deficient colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2018;42(1):60–8.
24. Backes Y, Elias SG, Groen JN, et al. Histologic factors associated with need for surgery in patients with pedunculated T1 colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 2018;154(6):1647–59.
25. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: Time to take notice. *Mod Pathol* 2012;25(10):1315–25.
26. Grizzi F, Celesti G, Basso G, et al. Tumor budding as a potential histopathological biomarker in colorectal cancer: Hype or hope? *World J Gastroenterol* 2012;18(45):6532–6.
27. Barresi V, Bonetti LR, Branca G, et al. Colorectal carcinoma grading by quantifying poorly differentiated cell clusters is more reproducible and provides more robust prognostic information than conventional grading. *Virchows Arch* 2012;461(6):621–8.
28. Barresi V, Bonetti LR, Ieni A, et al. Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predicts nodal involvement and pTNM stage in colorectal cancer patients. *Hum Pathol* 2014;45(2):268–75.
29. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13(16):4807–16.
30. Lokuhetty D, White VA, Watanabe R, et al. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Digestive System Tumours; 2019.
31. Ueno H, Kajiura Y, Shimazaki H, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2012;36(2):193–201.
32. Barresi V, Bonetti LR, Ieni A. Prognostic significance of grading based on the counting of poorly differentiated clusters in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2015;46(11):1722–9.
33. Tamaki Y. One - step nucleic acid amplification (OSNA): Where do we go with it ? *Int J Clin Oncol* 2017;22(1):3–10.

34. Kevans D, Wang LM, Sheahan K, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *Int J Surg Pathol* 2011;19(6):751–60.
35. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, et al. Poorly differentiated clusters: Clinical impact in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2017;16(1):9–15.
36. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, et al. Prognostic markers for colorectal cancer: Estimating ploidy and stroma. *Clin Transl Oncol* 2018;391(2): 2128–39.
37. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, et al. Histologic prognostic markers in stage IIA colorectal cancer: A comparative study. *Scand J Gastroenterol* 2016;51(3):314–20.
38. Barresi V, Branca G, Ieni A, et al. Poorly differentiated clusters (PDCs) as a novel histological predictor of nodal metastases in pT1 colorectal cancer. *Virchows Arch* 2014;464(6):655–62.
39. Chok KSH, Lun LW. Prognostic factors affecting survival and recurrence of patients with pT1 and pT2 colorectal cancer. *World J Surg* 2007;31:1485–90.
40. Peg V, Sansano I, Vieites B, et al. Role of total tumour load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients. *Breast* 2017;33:8–13.
41. Rubio IT, Espinosa-Bravo M, Rodrigo M, et al. Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(2):371–80.
42. Espinosa-Bravo M, Sansano I, Pérez-Hoyos S, 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. *Eur J Surg Oncol* 2013;39(7):766–73.
43. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol* 2013; 44(5):697–705.
44. Bokhorst JM, Blank A, Lugli A, et al. Assessment of individual tumor buds using keratin immunohistochemistry: Moderate interobserver agreement suggests a role for machine learning. *Mod Pathol* 2019;33:825–33.
45. Konishi T, Shimada Y, Lee LH, et al. Poorly differentiated clusters predict colon cancer recurrence: An in-depth comparative analysis of invasive-front prognostic markers. *Am J Surg Pathol* 2018;42(6):705–14.

Open Access This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Artículo 2:

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

Diaz-Mercedes, S., Archilla, I., Lahoz, S., Rodrigo-Calvo, M. T., Lopez-Prades, S.,
Tarragona, J., Landolfi, S., Concha, A., Machado, I., Maurel, J., Chic, N., Castells,
A., Balaguer, F., Camps, J., & Cuatrecasas, M.

Cancers (Basel). 2022;14(24):6072

Resumen

El estadiaje ganglionar en cáncer colorrectal (CCR) es fundamental a la hora de determinar el pronóstico de estos pacientes. El análisis histológico convencional de los ganglios linfáticos (GLs) no está exento de sesgos al analizar únicamente una pequeña porción del GL. El objetivo del presente estudio multicéntrico es comparar el rendimiento de la realización de extensiones citológicas de los GLs como método de estadiaje ganglionar alternativo, comparándolo con el estadiaje histológico convencional y con el método OSNA.

Se analizaron 3.936 GLs de 217 pacientes mediante las tres técnicas: H&E, extensiones citológicas y OSNA. La evaluación ganglionar mediante H&E detectó un 29% de casos con metástasis ganglionar, mientras que las extensiones citológicas detectaron un 35% de casos y la técnica OSNA un 33,2% ($p < 0,0001$). El análisis ganglionar mediante extensiones citológicas identificó un fue concordante con el análisis convencional en el 92,2% de los casos, presentando una sensibilidad y especificidad del 96,8% y 90,3% respectivamente ($p = 0,004$); y del 87,3% y 89% comparado con la evaluación por OSNA ($p = 0,056$). La detección de metástasis ganglionar por cualquiera de los tres métodos se asoció a una peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.

Estos resultados muestran que el análisis ganglionar mediante extensiones citológicas es capaz de detectar un mayor número de ganglios metastásicos que el análisis convencional mediante H&E, lo que permitiría utilizar la totalidad del GL para su evaluación molecular mediante 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 Department, 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: jcamp@recerca.clinic.cat (J.C.); mcutrec@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/ μ L 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°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.

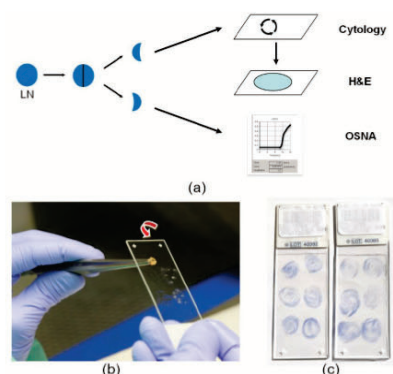


Figure 1. Fresh lymph node analysis with three methods, cytology smears, H&E, and OSNA. (a) Dissected lymph nodes were bisected. A cytology smear was performed on a pre-treated slide, and that part of the lymph node was then used for FFPE and histology analysis with H&E. The other half of the LN was 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).

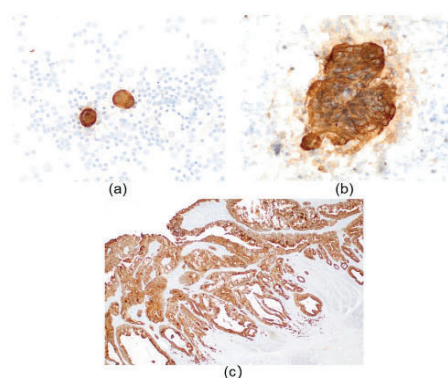


Figure 2. CK19 immunocytochemistry. (a) Positive CK19 immunocytochemistry stains of cytology smears from different lymph nodes showing few solitary tumour cells. (b) A group of positive tumour cells from a cytology smear. (c) A primary colorectal carcinoma positive for CK19 immunohistochemistry.

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).

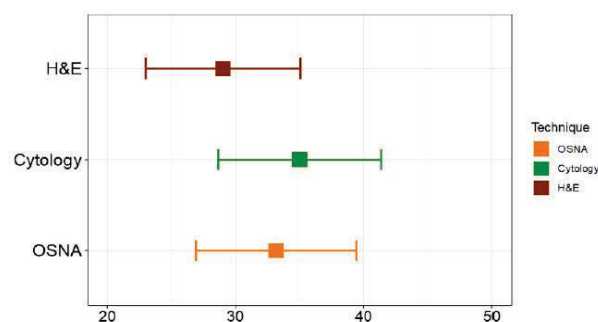


Figure 3. Forest plot displaying the positive detection rate, or proportion of patients with positive lymph nodes, of the three methods of LN analysis. H&E: haematoxylin and eosin; OSNA: one-step nucleic acid amplification.

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).

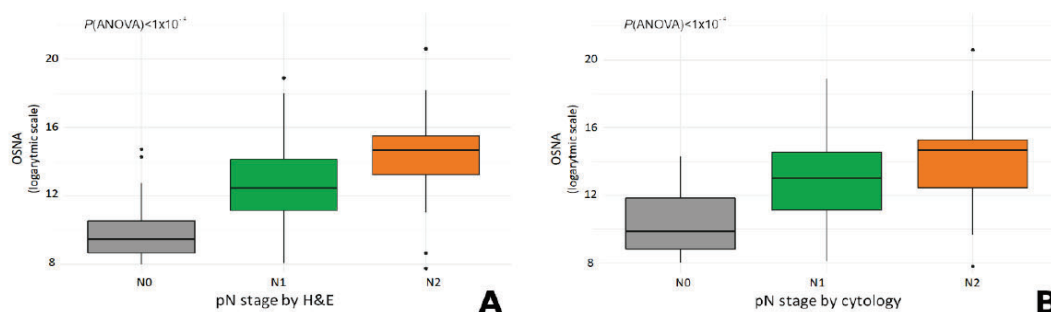


Figure 4. Total tumour load (TTL) values obtained by OSNA were correlative to the pN stages determined by (A) H&E and (B) cytology-based analysis. p -values were determined using an ANOVA test. Tumours with OSNA > 300,000 (superior outlier values) were excluded from both graphs to enable a better visualization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

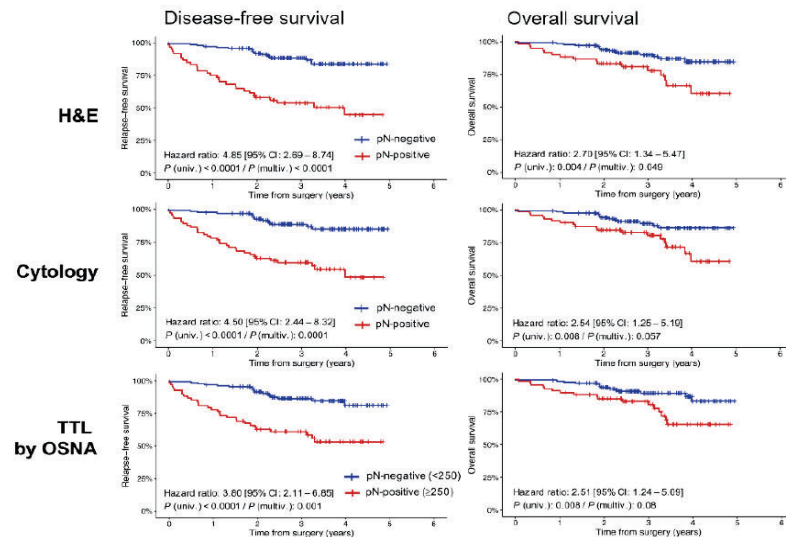


Figure 5. Kaplan-Meier estimates displaying RFS and OS rates according to pN-positive/negative patients by the three methods of LN analysis. *p*-values were calculated using a log-rank test and hazard ratios (HRs) by Cox proportional hazards models both in univariate and multivariable settings. Multivariable 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)	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)	<i>p</i> -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 grant 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

- 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](#)]
- NCCN. Colon Cancer. In *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2018; p. 392. [[CrossRef](#)]
- 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 perianapillary adenocarcinomas with survival. *JAMA Surg.* **2017**, *152*, 82–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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](#)]
- 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](#)]
- 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](#)]
- 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](#)]
- 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](#)]
- 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, L.; 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. Córdoba, 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*, 2320–7353.
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. Pählman, 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

El CCR tiene una elevada incidencia y prevalencia así como una elevada mortalidad asociada, constituyendo la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en ambos sexos. Este hecho hace que el CCR sea, junto con el cáncer de mama y el de cérvix, una de las principales dianas de los programas de cribado poblacional en nuestro medio. Gracias a estos programas de cribado se ha conseguido cambiar el paradigma de la enfermedad, al incrementar significativamente el número de casos diagnosticados en estadios precoces (144).

Pese a que la cirugía con intención curativa constituye el tratamiento estándar en estadios precoces de CCR, hasta un 10-15% de los pacientes en estadio II que no han recibido tratamiento adyuvante presentan recidiva de la enfermedad (43). Actualmente, el tratamiento adyuvante con quimioterapia se reserva exclusivamente para aquellos pacientes con CCR en estadio III o CCR en estadio II que presentan determinados factores clínico-patológicos de mal pronóstico, recogidos en distintas guías clínicas (42,44). Sin embargo, en un estudio retrospectivo en casi 25.000 CCR estadio II, se observó que hasta el 75% de estos pacientes presentaban uno o más factores de mal pronóstico, incluyendo obstrucción intestinal, perforación, pT4, alto grado histológico y menos de 12 GLs analizados; sin observar un beneficio del tratamiento adyuvante en cuanto a supervivencia a los 5 años entre aquellos pacientes que presentaban factores de mal pronóstico, con respecto a aquellos que no los presentaban (145). Estos hallazgos sugieren que, si bien estos parámetros clínico-patológicos se asocian a un peor pronóstico, no tienen capacidad predictiva sobre el potencial beneficio del tratamiento quimioterápico, lo que refuerza la necesidad de encontrar otros factores que puedan ayudar a seleccionar qué pacientes pueden beneficiarse del tratamiento adyuvante.

Como hemos comentado previamente, la presencia de metástasis ganglionar es el factor pronóstico más importante en CCR, , si bien en los últimos años se ha observado que la resección de los GLs no siempre está asociada a una mejora en la supervivencia de los pacientes. En base a ello, se ha postulado que la celularidad neoplásica presente en las metástasis linfáticas podría no ser el origen de las metástasis a distancia en el CCR, habiéndose descrito que en el 65% de los casos metastásicos el origen genético de las células metastásicas de los GLs es diferente del de las metástasis a distancia, mientras que solo el 35% comparten un origen subclonal común (146).

La evaluación histológica de los GLs continúa siendo el *gold standard* para el estadiaje pN. No obstante, su interpretación está sometida a cierta subjetividad y no está exenta de resultados falsos negativos, debido entre otras razones al sesgo de localización tumoral; de ahí la recomendación de las guías clínicas acerca de la necesidad de evaluar al menos 12 GLs en las piezas de resección quirúrgica (109). En este contexto, en los últimos años ha adquirido cada vez más importancia la detección de micrometástasis ganglionares en CCR, definidas a nivel histológico como grupos constituidos entre 10 y 20 células neoplásicas en una extensión de al menos 0.2 mm de diámetro (39). Su presencia se ha asociado a una peor supervivencia global y libre de enfermedad en estadios precoces de CCR (147–149) y, en su última edición, la AJCC recomienda considerar como positivos aquellos GLs donde se identifique su presencia, aunque sigue existiendo cierta controversia sobre el papel que puede tener la presencia de células tumorales aisladas. No obstante, la detección de micrometástasis mediante el análisis histológico convencional no es sencilla, habiéndose demostrado que la utilización de métodos de detección alternativos como cortes seriados, técnicas IHQ o técnicas moleculares con RT-PCR como el OSNA pueden incrementar su detección, si bien el valor

pronóstico de la positividad molecular por OSNA no está bien establecido en este contexto (150).

El OSNA se trata de una técnica cuantitativa y objetiva, con una elevada sensibilidad, entre el 86,2% y el 100%; y una especificidad de entre el 96,5% y el 98,4% en CCR; así como una tasa de concordancia del 95,7% - 98,7% con respecto a la evaluación histológica ganglionar convencional con H&E, además de presentar una baja tasa de falsos negativos (151).

En nuestro primer artículo, que constituye la mayor cohorte de CCR evaluada mediante OSNA hasta la fecha, hemos observado que una CTT superior a 6.000 copias/ μ l se correlaciona con una peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad. A pesar de que el punto de corte para definir la positividad ganglionar por OSNA se ha establecido tradicionalmente en 250 copias/ μ l, en nuestro estudio no existían diferencias estadísticamente significativas en los análisis de supervivencia cuando establecíamos el punto de corte en este umbral. En cáncer de mama, por ejemplo, se define como micrometástasis una positividad entre 250 copias/ μ l y 5.000 copias/ μ l, mientras que una CTT superior a 5.000 copias/ μ l se considera macrometástasis; si bien en el contexto de ganglio centinela, se han llegado a definir diferentes puntos de corte que varían de 2.150 copias/ μ l hasta 15.000 copias/ μ l como factor predictivo para determinar la probabilidad de metástasis axilares adicionales (118,152). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en cáncer de mama, donde la positividad por OSNA del GC supone la necesidad de realizar una linfadenectomía axilar, en la cirugía reglada de CCR la linfadenectomía forma parte del propio acto quirúrgico. De esta manera, el significado biológico de la presencia de ocasionales células neoplásicas en los GLs regionales ya resecados quirúrgicamente podría no tener un impacto significativo en la supervivencia de los pacientes al haber sido completamente extirpados, y es

solo a partir de un umbral determinado, en nuestro caso 6.000 copias/ μ l, que representa un verdadero factor pronóstico. Cabe añadir que en este primer estudio solo se utilizó una parte del GL para el análisis mediante OSNA, por lo que muy probablemente estos valores cambiarán cuando se analice todo el GL con ONSA, tal como ha ocurrido en el cáncer de mama.

De hecho, en línea con estos hallazgos, en diferentes estudios se ha observado positividad molecular en GLs de piezas de resección quirúrgicas por lesiones colorectales no infiltrantes, como adenomas o adenocarcinomas in situ (pTis). Aldecoa et al reportaron positividad por OSNA en 3/8 adenomas y en 10/17 pTis (129); mientras que Rodrigo et al reportaron positividad molecular en 11 de 39 pTis, cuyas CTT variaban entre 400 y 4.270 copias/ μ l, en ningún caso siendo superiores a 6.000 copias/ μ l (153). En este sentido, otras técnicas moleculares altamente sensibles, tales como la biopsia líquida, también han demostrado la presencia de ADN circulante tumoral en pacientes con lesiones precursoras (154). Estos hallazgos apoyarían la idea de que la detección de la presencia de pequeñas cantidades de ARNm de CK19 ganglionar podría no tener un impacto pronóstico en CCR.

En cuanto a su papel en estadios precoces, nuestro estudio incluía 139 casos con CCR estadio I y 130 estadios II, de los cuales únicamente 3 y 9 pacientes presentaron recidiva de la enfermedad respectivamente; lo que constituye una frecuencia muy baja de eventos. Por ello, no pudimos demostrar la existencia de una relación entre la detección molecular por OSNA y una peor supervivencia libre de enfermedad ni supervivencia global en estadios localizados. Sin embargo, otros estudios en CCR estadio II han descrito que la positividad molecular ganglionar por OSNA sí que se asocia a una peor supervivencia libre de enfermedad, aunque no a una peor supervivencia global (133). Otro estudio

japonés que evaluó la detección molecular de células neoplásicas en CCR estadio II mediante la detección de ARNm de CEA por qRT-PCR también determinó que el volumen de micrometástasis ganglionares se comporta como un factor predictor de recidiva en estadios precoces (155). En base a estos hallazgos, podría plantearse la utilidad de incorporar el estadiaje molecular ganglionar como otro factor de alto riesgo a tener en cuenta a la hora de valorar la necesidad de tratamiento adyuvante en estadios II, si bien sería necesario realizar estudios con cohortes más amplias y con un mayor tiempo de seguimiento.

De manera similar a resultados publicados previamente, también observamos en nuestro estudio que existía una correlación entre la CTT y el número de ganglios metastásicos por H&E, de manera que la CTT incrementaba gradualmente a medida que aumentaba el estadio pN. En nuestro estudio, la media observada de copias de ARNm de CK19 en estadio pN0 fue de 1.775 copias/ μ l, mientras que en estadios pN1 fue de 49.413 copias/ μ l, y en pN2 de 95.000 copias/ μ l, resultados muy similares a los reportados por Yamamoto et al, con 1.550 copias/ μ l en estadio pN0, 24.050 copias/ μ l en estadios pN1 y 90.600 copias/ μ l en estadios pN2 (122).

Merece la pena destacar también la asociación de la positividad molecular por OSNA con otros factores histológicos de alto riesgo en nuestro artículo, como son el estadio pT, la ILV, la IPN, la IVEM y el alto grado histológico, como ya se había descrito previamente (123). Sin embargo, hasta la fecha no se había descrito su asociación con otros dos factores histológicos que recientemente han alcanzado cierta relevancia en CCR como son el TB y los PDCs. Ambos se consideran manifestaciones morfológicas del fenotipo EMT, un proceso fisiológico que permite que las células epiteliales adquieran propiedades mesenquimales y con ello, un mayor potencial de migración e invasión estromal, esencial para el

desarrollo de metástasis (156). Tanto el TB como los PDCs han demostrado ser factores pronósticos independientes en cáncer de colon, y su presencia se ha asociado a metástasis ganglionar, al estadio pT, a un mayor grado tumoral, IPN, ILV, IVEM y metástasis a distancia (54). Además, también se ha descrito en la literatura que existe una buena correlación entre el grado de TB y el de PDCs (61,157) lo cual hemos podido confirmar en nuestra cohorte, tanto cuando ambos se evaluaron con H&E como cuando se utilizaron técnicas de IHQ para CK19.

Desde que en el 2016 el Consorcio Internacional de *tumor budding* definiera por primera vez las recomendaciones para la estandarización en el reporte del TB en CCR (55), se ha considerado al TB como un factor histológico de alto riesgo a considerar para seleccionar a pacientes en estadio II candidatos a tratamiento adyuvante por la guía de la ASCO (44), mientras que los PDCs todavía no se contemplan como factores de alto riesgo en las guías clínicas. Sin embargo, hay autores que consideran su superioridad en cuanto a la estratificación del riesgo con respecto a otros factores histológicos contemplados en las guías, como es el grado histológico. En este sentido, se considera que la evaluación del grado histológico presenta una serie de limitaciones, como son la subjetividad a la que está sometida la estimación del porcentaje de formación glandular, así como el hecho de que únicamente es aplicable al adenocarcinoma NOS y no a otros subtipos histológicos como el carcinoma medular, micropapilar, mucinoso o carcinoma con células en anillo de sello (158). Además, existen evidencias de que el significado pronóstico del grado histológico en CCR depende fundamentalmente del estado de inestabilidad de microsatélites, ya que los CCR de alto grado tienen peor pronóstico sólo si son MSS, mientras que se comportan como tumores de bajo grado en aquellos casos que presentan MSI (159). Por otro lado, se considera que la evaluación de los PDCs tiene una menor variabilidad interobservador al presentar

una mayor estandarización de los criterios empleados para su evaluación, además de que es aplicable a todos los subtipos histológicos de CCR y que mantiene su impacto pronóstico independientemente del estado de inestabilidad de microsatélites, sugiriendo que su determinación podría ser más precisa que la evaluación del grado histológico (56).

Adicionalmente, en nuestra cohorte no sólo observamos que existía una correlación positiva entre la positividad molecular por OSNA y la presencia de TB y de PDCs, sino que a medida que aumentaba el grado de TB y de PDCs, lo hacía también la CTT ganglionar. De esta manera, aquellos tumores Bd1 presentaban una CTT media de 3.292 copias/ μ l; los Bd2 de 18.002 copias/ μ l y los Bd3 de 45.331 copias/ μ l; mientras que los tumores con PDC G1 mostraron una CTT de 4.962 copias/ μ l, los PDC G2 de 13.146 copias/ μ l y los PDC G3 de 61.108 copias/ μ l. Este aumento exponencial de la CTT en función del grado de TB y de PDCs apoya el concepto biológico de que ambos factores están relacionados con un mayor grado de infiltración estromal y de capacidad metastásica.

Curiosamente, identificamos que no existían diferencias significativas entre los niveles de copias de ARNm de CK19 de los casos con bajo grado y los de grado intermedio, tanto para el TB como para los PDCs. Sin embargo, cuando estratificábamos ambos factores histológicos únicamente en dos grupos en vez de tres, diferenciando tumores con grado bajo-intermedio (Bd1+Bd2 y PDC G1+PDC G2) y grado alto (Bd3 y PDC G3), se mantenían diferencias estadísticamente significativas. Estos hallazgos sugieren que, para ambos factores, los casos intermedios podrían comportarse biológicamente como si se trataran de casos de bajo grado. En esta línea, diversos autores han propuesto su unificación en un sistema de gradación dual e incluso en un sistema de gradación unificado donde se contemplen ambos factores combinados, diferenciando aquellos casos de alto

grado (Bd3 + G2, Bd2 + G3 o Bd3 + G3) de los de bajo grado, lo que podría ayudar a aumentar la concordancia interobservador y a ser más preciso a la hora de determinar el impacto pronóstico (61).

Pese a su elevada sensibilidad, especificidad y tasa de concordancia, una de las principales limitaciones de la técnica OSNA es que no permite determinar el número exacto de GLs metastásicos, lo cual es requerido a la hora de determinar el estadio pN según las guías clínicas actuales. Por ello, esta técnica no permite realizar el estadiaje convencional. En este aspecto, se ha de tener en cuenta que todos los estudios realizados con OSNA hasta la fecha en el contexto de CCR han sido realizados utilizando una parte del GL para el análisis molecular, mientras que la parte restante se ha procesado para su evaluación convencional por H&E, lo que permite determinar el número exacto de GLs metastásicos. Este hecho no está exento de determinados sesgos a la hora de comparar la utilidad de la evaluación ganglionar por OSNA, como puede ser el sesgo de localización tumoral, lo que podría explicar por qué la concordancia no es del 100% cuando se compara la evaluación ganglionar mediante ambas técnicas, así como explicar la presencia de falsos negativos y falsos positivos de la técnica. Cabe añadir que, al utilizar una parte del GL para H&E, los resultados obtenidos con OSNA no corresponden a los valores reales de la CTT que presenta el GL en su totalidad, sino únicamente a la CTT de la sección del ganglio evaluada mediante OSNA. Por ello, el hecho de que la evaluación molecular de únicamente una hemisección del GL haya demostrado tener un impacto pronóstico supone un valor añadido a los resultados obtenidos hasta ahora, que podrían ser mucho más precisos si se utilizara todo el GL para analizarse con OSNA.

Con el objetivo de intentar minimizar este sesgo y poder utilizar todo el tejido ganglionar completo para su evaluación molecular, sin perder la

información relativa al número de ganglios metastásicos requeridos para el estadiaje ganglionar convencional, planteamos nuestro segundo estudio, que representa una fase intermedia antes de utilizar todo el GL para su evaluación mediante OSNA. En él comparamos tres métodos diferentes de evaluación ganglionar: el método convencional con H&E, el método OSNA, y extensiones citológicas de los GL disecados en fresco de las piezas de resección quirúrgica. De esta manera, los GLs se hemiseccionaban, realizando extensiones citológicas con una de las mitades que posteriormente se procesaría por el método convencional, y la mitad del GL restante se procesó por OSNA.

En este segundo estudio observamos que existía una muy buena concordancia entre las extensiones citológicas y la evaluación histológica convencional, así como una sensibilidad y especificidad del 96,8% y 90,3%, respectivamente, y un VPN del 98,6%. Además, se alcanzaba un sobreestadiaje del 6% de los casos, es decir, tumores que por el método convencional no mostraban metástasis ganglionares, y que sí fueron detectadas con las extensiones citológicas. Esta elevada sensibilidad de la citología comparada con la H&E podría ser explicada por la suave presión que se aplica sobre el ganglio linfático cuando se realiza un movimiento circular sobre la preparación, lo que contribuye a distribuir de una manera más homogénea la posible celularidad epitelial contenida dentro del GL y que se pueda encontrar localizada en regiones más profundas del mismo. De esta manera, se podría evitar el sesgo de localización tumoral dentro de esa hemisección del ganglio, de forma que las células representadas en el corte histológico no tienen por qué corresponderse exactamente con las células observadas en la extensión.

En este sentido, la presencia de ocasionales células epiteliales metastásicas sí que podría verse reflejada en las extensiones citológicas, mientras que la

sensibilidad del OSNA está establecida en un mínimo de 250 copias/ μ l, por lo que la detección de células tumorales aisladas podría darnos resultados falsos negativos en el OSNA. Esto podría explicar por qué la citología presenta una sensibilidad mayor que la técnica OSNA; si bien, como se ha comentado previamente, existe cierta controversia sobre el significado biológico que puede representar la presencia de células tumorales aisladas en GLs en el contexto de CCR (150).

Además, cuando comparamos la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del OSNA con respecto a la evaluación convencional por H&E observamos que estas eran discretamente inferiores que los valores descritos para las extensiones citológicas. De nuevo, merece la pena recordar que la hemisección de la que se realizaron las extensiones es la que posteriormente se utilizó para la evaluación histológica convencional; lo que pone de manifiesto que el análisis convencional de una hemisección del ganglio podría no reflejar fielmente lo que se encuentra localizado en la hemisección que se evalúa mediante OSNA debido a un sesgo de localización tumoral.

Sin embargo, cuando se comparó el valor pronóstico de los tres métodos de estadificación ganglionar, se observó que la positividad ganglionar evaluada tanto por el método convencional, como mediante las extensiones citológicas, así como por la técnica OSNA (considerando como positivos aquellos casos que tenían una CTT superior a 250 copias/ μ l) se relacionaba con una peor supervivencia libre de enfermedad y peor supervivencia global. Cabe mencionar que el impacto pronóstico de la evaluación mediante la técnica OSNA se realizó para una CTT superior a 250 copias/ μ l y no para una CTT > 6.000 copias/ μ l, debido a que únicamente 15 de los 217 pacientes presentaban una CTT superior a las 6.000 copias/ μ l en nuestra cohorte.

Este es el primer estudio hasta la fecha que compara el valor pronóstico de la realización de extensiones citológicas para el estadiaje ganglionar en CCR. Esto abre la puerta a considerar la utilización de todo el GL para el análisis molecular ganglionar por OSNA, ya que la realización de extensiones citológicas permitiría cumplir con las guías actuales, que obligan a establecer un estadio pN valorado en función del número de GLs metastásicos. De esta manera todo el tejido ganglionar, una vez realizadas las extensiones citológicas, se podría emplear para su estudio molecular por OSNA, lo que disminuiría significativamente el sesgo de localización tumoral, que es una de las principales limitaciones y fuentes de discrepancia actuales cuando se comparan los métodos de OSNA con la evaluación convencional ganglionar.

En este aspecto, cabe mencionar que se encuentra en marcha un estudio prospectivo multicéntrico (estudio ELNMA, *Entire Lymph Node Molecular Analysis*) en el que, tras la disección en fresco de los GLs, se realizan extensiones citológicas y se utiliza todo el GL para su análisis con OSNA. De esta manera, la evaluación del impacto pronóstico de la estadificación molecular ganglionar mediante la técnica OSNA del GL completo podría arrojar más luz sobre los resultados aquí expuestos, especialmente en estadios precoces de CCR. Pese a que hemos demostrado que una CTT superior a 6.000 copias/ μ l tiene un impacto pronóstico, este punto de corte podría estar infraestimado al evaluarse únicamente una sección del ganglio linfático.

A la vista de los resultados obtenidos en ambos dos estudios se pone de manifiesto la importancia de un estadiaje ganglionar preciso en CCR, estableciéndose como un factor pronóstico fundamental. La implementación de métodos sensibles para el análisis ganglionar, que permitan la detección de metástasis de una forma objetiva y cuantificable, podría ayudar a la hora de

valorar la necesidad de tratamiento adyuvante en estadios precoces de CCR, contribuyendo a un mejor manejo clínico de los pacientes.

CONCLUSIONES

1. La evaluación ganglionar mediante la técnica OSNA tiene valor pronóstico en cáncer colorrectal.
2. Una carga tumoral total superior a 6.000 copias de ARNm de CK19/ μ l se asocia a peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.
3. La positividad por OSNA se correlaciona con la mayoría de los factores pronósticos en CCR, incluyendo el *tumor budding* y los *poorly differentiated clusters*.
4. La determinación de la carga tumoral total podría utilizarse para valorar la necesidad de tratamiento adyuvante en CCR en estadio II.
5. Se puede determinar el número de ganglios linfáticos metastásicos y realizar un estadiaje ganglionar pN de acuerdo con las guías actuales mediante la realización de extensiones citológicas.
6. La realización de extensiones citológicas de los ganglios linfáticos para establecer el estadio pN presenta una elevada sensibilidad y especificidad.
7. La realización de extensiones citológicas permite utilizar la totalidad del ganglio linfático para su evaluación molecular mediante OSNA.

BIBLIOGRAFÍA

1. GLOBOCAN 2020. International Agency for Research on Cancer - WHO [Internet] [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/724-spain-fact-sheets.pdf>
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
3. Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int J Cancer*. 2016 Dec 1;139(11):2436–46.
4. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, Vignat J, Giovannucci EL, McGlynn KA, et al. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology*. 2020 Jul 1;159(1):335-349.e15.
5. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 May;70(3):145–64.
6. Cerdá Mota T, Ascunce Elizaga N, Sociedad Española de Epidemiología. Implantación y evaluación de programas poblacionales de cribado. EMISA; 2006.
7. Cubiella J, Marzo-Castillejo M, Mascort-Roca JJ, Amador-Romero FJ, Bellas-Beceiro B, Clofent-Vilaplana J, et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and prevention of colorectal cancer. 2018 Update. *Gastroenterol Hepatol*. 2018 Nov 1;41(9):585–96.
8. Williams JR, Ayscue JM. Colorectal cancer screening: A review of current screening options, timing, and guidelines. *J Surg Oncol*. 2023 Jun 24;127(8):1236–46.
9. Quintero E. ¿Test químico o test inmunológico para la detección de sangre oculta en heces en el cribado del cáncer colorrectal? *Gastroenterol Hepatol*. 2009 Oct;32(8):565–76.
10. Alves Martins BA, de Bulhões GF, Cavalcanti IN, Martins MM, de Oliveira PG, Martins AMA. Biomarkers in Colorectal Cancer: The Role of Translational Proteomics Research. *Front Oncol*. 2019 Nov 27;9.
11. Fitzpatrick-Lewis D, Ali MU, Warren R, Kenny M, Sherifali D, Raina P. Screening for Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 15, *Clinical Colorectal Cancer*. Elsevier Inc.; 2016. p. 298–313.
12. Hassan C, Rossi PG, Camilloni L, Rex DK, Jimenez-Cendales B, Ferroni E, et al. Meta-analysis: Adherence to colorectal cancer screening and the detection rate for advanced neoplasia, according to the type of screening test. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 Nov;36(10):929–40.
13. Dhaliwal A, Vlachostergios PJ, Oikonomou KG, Moshenyat Y. Fecal DNA Testing for Colorectal Cancer Screening: Molecular Targets and Perspectives. *World J Gastrointest Oncol*. 2015 Oct 15;7(10):178–83.
14. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *New England Journal of Medicine*. 2014 Apr 3;370(14):1287–97.

15. Naber SK, Knudsen AB, Zauber AG, Rutter CM, Fischer SE, Pabiniak CJ, et al. Cost-effectiveness of a multitarget stool DNA test for colorectal cancer screening of Medicare beneficiaries. *PLoS One*. 2019 Sep 1;14(9).
16. Duran-Sanchon S, Moreno L, Gómez-Matas J, Augé JM, Serra-Burriel M, Cuatrecasas M, et al. Fecal MicroRNA-Based Algorithm Increases Effectiveness of Fecal Immunochemical Test-Based Screening for Colorectal Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2021 Feb 1;19(2):323-330.e1.
17. Quintero E, Castells A, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, Lanas Á, et al. Colonoscopy versus Fecal Immunochemical Testing in Colorectal-Cancer Screening. *New England Journal of Medicine*. 2012 Feb 23;366(8):697–706.
18. Jover R, Herráiz M, Alarcón O, Brullet E, Bujanda L, Bustamante M, et al. Clinical practice Guidelines: quality of colonoscopy in colorectal cancer screening. *Endoscopy*. 2012 Apr 21;44(04):444–51.
19. Castells A, Bessa X, Quintero E, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, et al. Risk of advanced proximal neoplasms according to distal colorectal findings: comparison of sigmoidoscopy-based strategies. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(12):878–86.
20. Holme Ø, Schoen RE, Senore C, Segnan N, Hoff G, Løberg M, et al. Effectiveness of flexible sigmoidoscopy screening in men and women and different age groups: Pooled analysis of randomised trials. *BMJ (Online)*. 2017;356.
21. Shaukat A, Levin TR. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Aug 3;19(8):521–31.
22. Kim DH, Pickhardt PJ, Taylor AJ, Leung WK, Winter TC, Hinshaw JL, et al. CT Colonography versus Colonoscopy for the Detection of Advanced Neoplasia. *New England Journal of Medicine*. 2007 Oct 4;357(14):1403–12.
23. Health Quality Ontario. Colon Capsule Endoscopy for the Detection of Colorectal Polyps: An Evidence-Based Analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2015;15(14):1–39.
24. Williams JR, Ayscue JM. Colorectal cancer screening: A review of current screening options, timing, and guidelines. Vol. 127, *Journal of Surgical Oncology*. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 1236–46.
25. Molnár B, Tóth K, Barták BK, Tulassay Z. Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015 Feb 27;15(2):171–84.
26. Sun J, Zheng MY, Li YW, Zhang SW. Structure and function of Septin 9 and its role in human malignant tumors. *World J Gastrointest Oncol*. 2020;12(6):619–31.
27. Potter NT, Hurban P, White MN, Whitlock KD, Lofton-Day CE, Tetzner R, et al. Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma. *Clin Chem*. 2014;60(9):1183–91.
28. Jensen SØ, Øgaard N, Ørntoft MBW, Rasmussen MH, Bramsen JB, Kristensen H, et al. Novel DNA methylation biomarkers show high sensitivity and specificity for blood-based

detection of colorectal cancer—a clinical biomarker discovery and validation study. *Clin Epigenetics*. 2019 Dec 14;11(1):158.

29. Zanutto S, Ciniselli CM, Belfiore A, Lecchi M, Masci E, Delconte G, et al. Plasma miRNA-based signatures in CRC screening programs. *Int J Cancer*. 2020 Feb 15;146(4):1164–73.
30. Bhardwaj M, Weigl K, Tikk K, Benner A, Schrotz-King P, Brenner H. Multiplex screening of 275 plasma protein biomarkers to identify a signature for early detection of colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2020 Jan 1;14(1):8–21.
31. Jain S, Maque J, Galoosian A, Osuna-Garcia A, May FP. Optimal Strategies for Colorectal Cancer Screening. Vol. 23, *Current Treatment Options in Oncology*. Springer; 2022. p. 474–93.
32. Grobbee EJ, Lam SY, Fuhler GM, Blakaj B, Konstantinov SR, Bruno MJ, et al. First steps towards combining faecal immunochemical testing with the gut microbiome in colorectal cancer screening. *United European Gastroenterol J*. 2020 Apr 1;8(3):293–302.
33. Li T, Nakatsu G, Chen YX, Yau TO, Chu E, Wong S, et al. A novel faecal *Lachnoclostridium* marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer. *Gut*. 2020 Jul 1;69(7):1248–57.
34. Network of Cancer Screening Programs. Current situation of CRC screening in Spain: Implementation and indicators. 2017 [Internet] [cited 2023 Sep 03]. Available from: <https://cribadocancer.es/download/situacion-de-los-programas-de-cancer-colorrectal-2019-indicadores-2017/>
35. Cancer Strategy of the National Health System Ministry of Health. 2021 [Internet] [cited 2023 Sep 11]. Available from: https://www.sanidad.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/Estrategia_en_cancer_del_Sistema_Nacional_de_Salud_Actualizacion_2021.pdf
36. Burón A, Macià F, Andreu M, Pellisé M, Castells X, Grau J. Population-based colorectal cancer screening: Interval cancers and relationship with the quantitative faecal immunological for hemoglobin. *Med Clin (Barc)*. 2019 Apr 18;152(8):303–6.
37. Portillo I, Idígoras I, Ojembarrena E, Arana E, Luis Hurtado J, Basurko R, et al. Lesiones detectadas en el programa de cribado de cáncer colorrectal en el País Vasco: Primera ronda 2009-2011. *Gastroenterol Hepatol*. 2013 May;36(5):301–8.
38. Binefa G, Garcia M, Milà N, Fernández E, Rodríguez-Moranta F, Gonzalo N, et al. Colorectal Cancer Screening Programme in Spain: Results of Key Performance Indicators After Five Rounds (2000–2012). *Sci Rep*. 2016 Jan 20;6(1):19532.
39. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer; 2017.
40. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Oct 1;133(10):1539–51.

41. Freeman HJ. Early stage colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 14;19(46):8468–73.
42. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2020 Oct 1;31(10):1291–305.
43. Pålman LA, Hohenberger WM, Matzel K, Sugihara K, Quirke P, Glimelius B. Should the Benefit of Adjuvant Chemotherapy in Colon Cancer Be Re-Evaluated? *Journal of Clinical Oncology*. 2016 Apr 20;34(12):1297–9.
44. Baxter NN, Kennedy EB, Bergsland E, Berlin J, George TJ, Gill S, et al. Adjuvant Therapy for Stage II Colon Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2021;40:892–910.
45. Rebutzi SE, Pesola G, Martelli V, Sobrero AF. Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 10;12(9):2584.
46. Shi Q, Andre T, Grothey A, Yothers G, Hamilton SR, Bot BM, et al. Comparison of outcomes after fluorouracil-based adjuvant therapy for stages II and III colon cancer between 1978 to 1995 and 1996 to 2007: Evidence of stage migration from the ACCENT database. In: *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2013. p. 3656–63.
47. Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Annals of surgical oncology : the official journal of the Society of Surgical Oncology*. 2003;10(1):65–71.
48. Santos C, López-Doriga A, Navarro M, Mateo J, Biondo S, Martínez Villacampa M, et al. Clinicopathological risk factors of Stage II colon cancer: Results of a prospective study. *Colorectal Disease*. 2013 Apr;15(4):414–22.
49. Lim SB, Yu CS, Jang SJ, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010 Apr;53(4):377–84.
50. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer. *Cancer*. 2012 Feb 1;118(3):628–38.
51. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer. *Cancer*. 2009 Aug 1;115(15):3379–91.
52. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Nov 1;27(31):5131–7.
53. Ueno H, Shinto E, Kajiwarra Y, Fukazawa S, Shimazaki H, Yamamoto J, et al. Prognostic impact of histological categorisation of epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014 Nov 25;111(11):2082–90.
54. Lugli A, Zlobec I, Berger MD, Kirsch R, Nagtegaal ID. Tumour budding in solid cancers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Feb 8;18(2):101–15.

55. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology*. 2017 Sep 1;30(9):1299–311.
56. Shivji S, Conner JR, Barresi V, Kirsch R. Poorly differentiated clusters in colorectal cancer: a current review and implications for future practice. *Histopathology*. 2020 Sep 23;77(3):351–68.
57. Ueno H, Kajiwarra Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New Criteria for Histologic Grading of Colorectal Cancer. *American Journal of Surgical Pathology*. 2012 Feb;36(2):193–201.
58. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Domati F, Tuccari G. Prognostic significance of grading based on the counting of poorly differentiated clusters in colorectal mucinous adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2015 Nov 1;46(11):1722–9.
59. Cappellesso R, Luchini C, Veronese N, Lo Mele M, Rosa-Rizzotto E, Guido E, et al. Tumor budding as a risk factor for nodal metastasis in pT1 colorectal cancers: a meta-analysis. *Hum Pathol*. 2017 Jul 1;65:62–70.
60. Ueno H, Ishiguro M, Nakatani E, Toshiaki Ishikawa ;, Uetake H, Matsuda ; Chu, et al. Prospective Multicenter Study on the Prognostic and Predictive Impact of Tumor Budding in Stage II Colon Cancer: Results From the SACURA Trial. *J Clin Oncol*. 2019;37:1886–94.
61. Lee VWK, Chan KF. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in Stage II colon cancer. *Pathol Res Pract*. 2018 Mar 1;214(3):402–7.
62. Okuda Y, Shimura T, Yamada T, Hirata Y, Yamaguchi R, Sakamoto E, et al. Colorectal obstruction is a potential prognostic factor for stage II colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2018 Dec 1;23(6):1101–11.
63. Sabbagh C, Manceau G, Mege D, Abdalla S, Voron T, Bridoux V, et al. Is Adjuvant Chemotherapy Necessary for Obstructing Stage II Colon Cancer? Results from a Propensity Score Analysis of the French Surgical Association Database. *Ann Surg*. 2022 Jan 1;275(1):149–56.
64. Zhang C, Yin S, Tan Y, Huang J, Wang P, Hou W, et al. Patient Selection for Adjuvant Chemotherapy in High-Risk Stage II Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. 2020 Apr 1;43(4):279–87.
65. Konishi T, Shimada Y, Hsu M, Tufts L, Jimenez-Rodriguez R, Cercek A, et al. Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. *JAMA Oncol*. 2018 Mar 1;4(3):309.
66. Petrelli F, Ghidini M, Cabiddu M, Pezzica E, Corti D, Turati L, et al. Microsatellite Instability and Survival in Stage II Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Res*. 2019 Dec;39(12):6431–41.

67. Solar Vasconcelos JP, Boutin M, Loree JM. Circulating tumor DNA in early-stage colon cancer: ready for prime time or needing refinement? *Ther Adv Med Oncol*. 2022 Jan 18;14:175883592211439.
68. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016 Jul 6;8(346).
69. Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB, Boland P, et al. ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal–Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Dec 1;17(12):757–70.
70. Parent P, Cohen R, Rassy E, Svrcek M, Taieb J, André T, et al. A comprehensive overview of promising biomarkers in stage II colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*. 2020 Aug;88:102059.
71. Yoon PS, Del Piccolo N, Shirure VS, Peng Y, Kirane A, Canter RJ, et al. Advances in Modeling the Immune Microenvironment of Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2021 Feb 10;11.
72. Wood G, Grenader T, Nash S, Adams R, Kaplan R, Fisher D, et al. Derived neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer according to RAS and BRAF status: A post-hoc analysis of the MRC COIN study. *Anticancer Drugs*. 2017 Mar 1;28(5):546–50.
73. Rozek LS, Schmit SL, Greenson JK, Tomsho LP, Rennert HS, Rennert G, et al. Tumor-Infiltrating lymphocytes, Crohn’s-like lymphoid reaction, and survival from colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2016 Aug 1;108(8).
74. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet*. 2018 May 26;391(10135):2128–39.
75. Steele CD, Abbasi A, Islam SMA, Bowes AL, Khandekar A, Haase K, et al. Signatures of copy number alterations in human cancer. *Nature*. 2022 Jun 30;606(7916):984–91.
76. Lahoz S, Archilla I, Asensio E, Hernández-Illán E, Ferrer Q, López-Prades S, et al. Copy-number intratumor heterogeneity increases the risk of relapse in chemotherapy-naive stage II colon cancer. *Journal of Pathology*. 2022 May 1;257(1):68–81.
77. Camps J, Quang TN, Padilla-Nash HM, Knutsen T, McNeil NE, Wangsa D, et al. Integrative genomics reveals mechanisms of copy number alterations responsible for transcriptional deregulation in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Nov;48(11):1002–17.
78. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350–6.
79. Allen WL, Dunne PD, McDade S, Scanlon E, Loughrey M, Coleman HG, et al. Transcriptional Subtyping and CD8 Immunohistochemistry Identifies Patients With Stage II and III Colorectal Cancer With Poor Prognosis Who Benefit From Adjuvant Chemotherapy. *JCO Precis Oncol*. 2018 Nov;(2):1–15.

80. Syed YY. Oncotype DX Breast Recurrence Score®: A Review of its Use in Early-Stage Breast Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2020 Oct 1;24(5):621–32.
81. Venook AP, Niedzwiecki D, Lopatin M, Ye X, Lee M, Friedman PN, et al. Biologic determinants of tumor recurrence in stage II colon cancer: Validation study of the 12-gene recurrence score in cancer and leukemia group B (CALGB) 9581. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 May 10;31(14):1775–81.
82. Yothers G, O’Connell MJ, Lee M, Lopatin M, Clark-Langone KM, Millward C, et al. Validation of the 12-gene colon cancer Recurrence Score in NSABP C-07 as a predictor of recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with fluorouracil and leucovorin (FU/LV) and FU/LV plus oxaliplatin. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(36):4512–9.
83. Yamanaka T, Oki E, Yamazaki K, Yamaguchi K, Muro K, Uetake H, et al. 12-Gene Recurrence Score assay stratifies the recurrence risk in stage II/III colon cancer with surgery alone: The sunrise study. *Journal of Clinical Oncology*. 2016 Aug 20;34(24):2906–13.
84. Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P, Davison T, Black JM, Kay EW, et al. Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Dec 10;29(35):4620–6.
85. Niedzwiecki D, Frankel WL, Venook AP, Ye X, Friedman PN, Goldberg RM, et al. Association Between Results of a Gene Expression Signature Assay and Recurrence-Free Interval in Patients With Stage II Colon Cancer in Cancer and Leukemia Group B 9581 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*. 2016 Sep 1;34(25):3047–53.
86. Low YS, Blöcker C, McPherson JR, Tang SA, Cheng YY, Wong JYS, et al. A formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)-based prognostic signature to predict metastasis in clinically low risk stage I/II microsatellite stable colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2017 Sep 10;403:13–20.
87. Dimberg J, Andersson RE, Haglund S. Genomic Profiling of Stage II Colorectal Cancer Identifies Candidate Genes Associated with Recurrence-Free Survival, Tumor Location, and Differentiation Grade. *Oncology*. 2020;98(8):575–82.
88. Zaniboni A, Formica V. The Best. First. Anti-EGFR before anti-VEGF, in the first-line treatment of RAS wild-type metastatic colorectal cancer: from bench to bedside. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Aug 18;78(2):233–44.
89. van Brummelen EMJ, de Boer A, Beijnen JH, Schellens JHM. BRAF Mutations as Predictive Biomarker for Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies . *Oncologist*. 2017 Jul 1;22(7):864–72.
90. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: Pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Annals of Oncology*. 2016 Sep 1;27(9):1746–53.
91. Li L, Ni BB, Zhong QH, Liu YH, Zhang MH, Zhang KP, et al. Investigation of correlation between mutational status in key EGFR signaling genes and prognosis of stage II colorectal cancer. *Future Oncology*. 2017 Jul 1;13(17):1473–92.

92. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Jan 20;28(3):466–74.
93. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6063–9.
94. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994 Dec;372(6506):525–30.
95. Richtig G, Aigelsreiter A, Schwarzenbacher D, Ress AL, Adiprasito JB, Stiegelbauer V, et al. SOX9 is a proliferation and stem cell factor in hepatocellular carcinoma and possess widespread prognostic significance in different cancer types. *PLoS One*. 2017;12(11):1–15.
96. Wang HY, Lian P, Zheng PS. SOX9, a potential tumor suppressor in cervical cancer, transactivates p21WAF1/CIP1 and suppresses cervical tumor growth. *Oncotarget*. 2015;6(24):20711–22.
97. Blache P, Van De Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, et al. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *Journal of Cell Biology*. 2004;166(1):37–47.
98. Prévostel C, Blache P. The dose-dependent effect of SOX9 and its incidence in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2017;86:150–7.
99. Aguilar-Medina M, Avendaño-Félix M, Lizárraga-Verdugo E, Bermúdez M, Romero-Quintana JG, Ramos-Payan R, et al. SOX9 Stem-Cell Factor: Clinical and Functional Relevance in Cancer. *J Oncol*. 2019 Apr 1;2019:1–16.
100. Prévostel C, Rammah-Bouazza C, Trauchessec H, Canterel-Thouennon L, Busson M, Ychou M, et al. SOX9 is an atypical intestinal tumor suppressor controlling the oncogenic Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget*. 2016;7(50):82228–43.
101. Javier BM, Yaeger R, Wang L, Sanchez-Vega F, Zehir A, Middha S, et al. Recurrent, truncating Sox9 mutations are associated with sox9 overexpression, KRAS mutation, and TP53 wild type status in colorectal carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(32):50875–82.
102. Smolarz B, Durczyński A, Romanowicz H, Szyłło K, Hogendorf P. miRNAs in Cancer (Review of Literature). *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 3;23(5):2805.
103. Yamazaki N, Koga Y, Taniguchi H, Kojima M, Kanemitsu Y, Saito N, et al. High expression of miR-181c as a predictive marker of recurrence in stage II colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 24;8(4):6970–83.
104. Tsukamoto M, Iinuma H, Yagi T, Matsuda K, Hashiguchi Y. Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer. *Oncology (Switzerland)*. 2017 May 1;92(6):360–70.

105. To KK, Tong CW, Wu M, Cho WC. MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World J Gastroenterol*. 2018 Jul 21;24(27):2949–73.
106. Fortea-Sanchis C, Martínez-Ramos D, Escrig-Sos J. The lymph node status as a prognostic factor in colon cancer: comparative population study of classifications using the logarithm of the ratio between metastatic and nonmetastatic nodes (LODDS) versus the pN-TNM classification and ganglion ratio systems. *BMC Cancer*. 2018 Dec 4;18(1):1208.
107. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph Node Evaluation and Survival After Curative Resection of Colon Cancer: Systematic Review. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2007 Mar 21;99(6):433–41.
108. Abbassi-Ghadi N, Boshier PR, Goldin R, Hanna GB. Techniques to increase lymph node harvest from gastrointestinal cancer specimens: a systematic review and meta-analysis. *Histopathology*. 2012 Oct;61(4):531–42.
109. Loughrey MB, Quirke P, Shepherd NA. Dataset for histopathological reporting of colorectal cancer. The Royal College of Pathologist., editor. 2018.
110. Burghgraef TA, Zweep AL, Sikkenk DJ, van der Pas MHGM, Verheijen PM, Consten ECJ. In vivo sentinel lymph node identification using fluorescent tracer imaging in colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021 Feb;158:103149.
111. van der Pas MH, Meijer S, Hoekstra OS, Riphagen II, de Vet HC, Knol DL, et al. Sentinel-lymph-node procedure in colon and rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2011 Jun;12(6):540–50.
112. Lucas K, Melling N, Giannou AD, Reeh M, Mann O, Hackert T, et al. Lymphatic Mapping in Colon Cancer Depending on Injection Time and Tracing Agent: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Designed Studies. *Cancers (Basel)*. 2023 Jun 15;15(12):3196.
113. Saha S, Philimon B, Efeson M, Helina A, Elgamal M, Kiya G, et al. The role of sentinel lymph node mapping in colon cancer: detection of micro-metastasis, effect on survival, and driver of a paradigm shift in extent of colon resection. *Clin Exp Metastasis*. 2022 Feb 26;39(1):109–15.
114. Wiese D, Sirop S, Yestrepsky B, Ghanem M, Bassily N, Ng P, et al. Ultrastaging of sentinel lymph nodes (SLNs) vs. non-SLNs in colorectal cancer-do we need both? *Am J Surg*. 2010 Mar;199(3):354–8.
115. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2007 Aug 15;13(16):4807–16.
116. Yamamoto N, Daito M, Hiyama K, Ding J, Nakabayashi K, Otomo Y, et al. An optimal mRNA marker for OSNA (one-step nucleic acid amplification) based lymph node metastasis detection in colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Mar;43(3):264–70.

117. Engels S, Brautmeier L, Reinhardt L, Wasylyow C, Hasselmann F, Henke RP, et al. Evaluation of fast molecular detection of lymph node metastases in prostate cancer patients using one-step nucleic acid amplification (Osna). *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 1;13(5):1–12.
118. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, De Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: A new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 May;139(1):87–93.
119. Rubio IT, Espinosa-Bravo M, Rodrigo M, Diaz MAV, Hardisson D, Sagasta A, et al. Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Sep 1;147(2):371–80.
120. Espinosa-Bravo M, Sansano I, Pérez-Hoyos S, Ramos M, Sancho M, Xercavins J, et al. Prediction of non-sentinel lymph node metastasis in early breast cancer by assessing total tumoral load in the sentinel lymph node by molecular assay. *European Journal of Surgical Oncology*. 2013 Jul;39(7):766–73.
121. Vieites B, López-García M, Martín-Salvago MD, Ramirez-Tortosa CL, Rezola R, Sancho M, et al. Predictive and prognostic value of total tumor load in sentinel lymph nodes in breast cancer patients after neoadjuvant treatment using one-step nucleic acid amplification: the NEOVATTL study. *Clinical and Translational Oncology*. 2021 Jul 1;23(7):1377–85.
122. 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 Jul;18(7):1891–8.
123. 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 Feb 1;23(2):391–6.
124. Colling R, Yeung T, Hompes R, Kraus R, Cahill R, Mortensen N, et al. OSNA testing for lymph node staging in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2017 Jul;70(7):638–9.
125. 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. *Br J Cancer*. 2014 May 13;110(10):2544–50.
126. Güller U, Zettl A, Worni M, Langer I, Cabalzar-Wondberg D, Viehl CT, et al. Molecular investigation of lymph nodes in colon cancer patients using one-step nucleic acid amplification (OSNA): A new road to better staging? *Cancer*. 2012 Dec 15;118(24):6039–45.
127. Croner RS, Schellerer V, Demund H, Schildberg C, Papadopoulos T, Naschberger E, et al. One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) - a new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *J Transl Med*. 2010 Dec 6;8(1):83.

128. Hiyoshi Y, Akiyoshi T, Fukunaga Y. The advantage of one-step nucleic acid amplification for the diagnosis of lymph node metastasis in colorectal cancer patients. *Ann Gastroenterol Surg.* 2021 Jan 29;5(1):60–6.
129. Aldecoa I, Atares B, Tarragona J, Bernet L, Sardon JD, Pereda T, et al. Molecularly determined total tumour load in lymph nodes of stage I–II colon cancer patients correlates with high-risk factors. A multicentre prospective study. *Virchows Archiv.* 2016 Oct 1;469(4):385–94.
130. Miyake Y, Mizushima T, Hata T, Takahashi H, Hanada H, Shoji H, et al. Inspection of Perirectal Lymph Nodes by One-Step Nucleic Acid Amplification Predicts Lateral Lymph Node Metastasis in Advanced Rectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2017 Dec 1;24(13):3850–6.
131. Marhic A, Tremblay JF, Kaci R, André T, Eveno C, Pocard M. Molecular analysis of sentinel lymph node in colon carcinomas by one-step nucleic acid amplification (OSNA) reduces time to adjuvant chemotherapy interval. *Digestive and Liver Disease.* 2017 Aug 1;49(8):924–8.
132. 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 Jan 14;15(1).
133. Itabashi M, Yamamoto H, Tomita N, Inomata M, Murata K, Hayashi S, et al. Lymph Node Positivity in One-Step Nucleic Acid Amplification is a Prognostic Factor for Postoperative Cancer Recurrence in Patients with Stage II Colorectal Cancer: A Prospective, Multicenter Study. *Ann Surg Oncol.* 2020 Apr 1;27(4):1077–83.
134. Weixler B, Teixeira da Cunha S, Warschkow R, Demartines N, Güller U, Zettl A, et al. Molecular Lymph Node Staging with One-Step Nucleic Acid Amplification and its Prognostic Value for Patients with Colon Cancer: The First Follow-up Study. *World J Surg.* 2021 May 1;45(5):1526–36.
135. La Fera E, Bizzarri N, Petrecca A, Monterossi G, Dinoi G, Zannoni GF, et al. Evaluation of the one-step nucleic acid amplification method for rapid detection of lymph node metastases in endometrial cancer: prospective, multicenter, comparative study. *International Journal of Gynecologic Cancer.* 2023 Jul;33(7):1063–9.
136. Togami S, Ushiwaka T, Kitazono I, Yanazume S, Kamio M, Tanimoto A, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for detecting lymph node metastasis in cervical and endometrial cancer: a preliminary study. *J Gynecol Oncol.* 2022;33(2).
137. Märkl B, Grosser B, Bauer K, Vlasenko D, Schenkirsch G, Probst A, et al. Ultrastaging using ex vivo sentinel lymph node mapping and one-step nucleic acid amplification (Osna) in gastric cancer: Experiences of a european center. *Cancers (Basel).* 2021 May 29;13(11).
138. 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. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Jan 4;12.

139. Peigné L, Godey F, Le Gallo M, Le Gall F, Fautrel A, Morcet J, et al. One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020 Mar;102:104553.
140. Hermida-Romero MT, Estévez-Pérez LS, Alen BO, Picchi F, Fernández-Prado R, de la Torre-Bravos M, et al. Molecular Detection of Lymph Node Metastases in Lung Cancer Patients Using the One-Step Nucleic Acid Amplification Method: Clinical Significance and Prognostic Value. *Cells.* 2022 Dec 1;11(24).
141. 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 Dec 1;22(1).
142. Zhou M, Wang X, Jiang L, Chen X, Bao X, Chen X. The diagnostic value of one step nucleic acid amplification (OSNA) in differentiating lymph node metastasis of tumors: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Surgery.* 2018 Aug;56:49–56.
143. Tranoulis A, Georgiou D, Yap J, Attard-Montalto S, Twigg J, Elattar A, et al. The evolving role of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for the intra-operative detection of lymph node metastases: A diagnostic accuracy meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology.* 2021 Jun;47(6):1233–43.
144. McClements PL, Madurasinghe V, Thomson CS, Fraser CG, Carey FA, Steele RJC, et al. Impact of the UK colorectal cancer screening pilot studies on incidence, stage distribution and mortality trends. *Cancer Epidemiol.* 2012 Aug;36(4):e232–42.
145. O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, Gangnon RE, Liou JI, Heise CP, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *Journal of Clinical Oncology.* 2011 Sep 1;29(25):3381–8.
146. Naxerova K, Reiter JG, Brachtel E, Lennerz JK, van de Wetering M, Rowan A, et al. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science (1979).* 2017 Jul 7;357(6346):55–60.
147. Sloothak DAM, van der Linden RLA, van de Velde CJH, Bemelman WA, Lips DJ, van der Linden JC, et al. Prognostic implications of occult nodal tumour cells in stage I and II colon cancer: The correlation between micrometastasis and disease recurrence. *European Journal of Surgical Oncology.* 2017 Aug 1;43(8):1456–62.
148. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, Thorlund K, Büchler MW, Koch M, et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology.* 2012 Jan 1;30(1):60–70.
149. Sloothak 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.

150. Yamamoto H. Micrometastasis in lymph nodes of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2022 Jul 26;6(4):466–73.
151. Crafa F, Vanella S, Catalano OA, Pomykala KL, Baiamonte M. Role of one-step nucleic acid amplification in colorectal cancer lymph node metastases detection. *World J Gastroenterol.* 2022 Aug 14;28(30):4019–43.
152. Terrenato I, D'Alicandro V, Casini B, Perracchio L, Rollo F, De Salvo L, et al. A cut-off of 2150 cytokeratin 19 mRNA copy number in sentinel lymph node may be a powerful predictor of non-sentinel lymph node status in breast cancer patients. *PLoS One.* 2017 Feb 1;12(2).
153. Rodrigo-Calvo MT, Saez de Gordo K, Lopez-Prades S, Archilla I, Diaz A, Berrios M, et al. Tumour Cell Seeding to Lymph Nodes from In Situ Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2023 Jan 30;15(3):842.
154. Hu Y, Chen Y, Guo H, Yu J, Chen Y, Liu Y, et al. Molecular alterations in circulating cell-free dna in patients with colorectal adenoma or carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2020;12:5159–67.
155. Yamamoto H, Murata K, Fukunaga M, Ohnishi T, Noura S, Miyake Y, et al. Micrometastasis volume in lymph nodes determines disease recurrence rate of stage II colorectal cancer: A prospective multicenter trial. *Clinical Cancer Research.* 2016 Jul 1;22(13):3201–8.
156. Findlay VJ, Wang C, Watson DK, Camp ER. Epithelial-to-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype: insights from cancer biology with therapeutic implications for colorectal cancer. *Cancer Gene Ther.* 2014 May 2;21(5):181–7.
157. Konishi T, Shimada Y, Lee LH, Cavalcanti MS, Hsu M, Smith JJ, et al. Poorly Differentiated Clusters Predict Colon Cancer Recurrence. *American Journal of Surgical Pathology.* 2018;42(6):705–14.
158. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol.* 2015 Sep;30(9):1059–67.
159. Rosty C, Williamson EJ, Clendenning M, Walters RJ, Win AK, Jenkins MA, et al. Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status? *Hum Pathol.* 2014 Oct;45(10):2077–84.