



Universitat de Lleida

Estudio de factores patológicos y moleculares con valor pronóstico y predictivo de respuesta en el carcinoma colo-rectal

Jordi Tarragona Foradada

<http://hdl.handle.net/10803/365318>



Estudio de factores patológicos y moleculares con valor pronóstico y predictivo de respuesta en el carcinoma colo-rectal està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

(c) 2015, Jordi Tarragona Foradada



Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques



TESIS DOCTORAL:

**“Estudio de factores patológicos y moleculares
con valor pronóstico y predictivo de respuesta en
el carcinoma colo-rectal”.**

Jordi Tarragona Foradada
Universitat de Lleida

Directors:
Dr. Xavier Matias-Guiu
Dra. Antonia Salud

*Als meus pares
Als meus germans
Al meu padri, in memoriam*

*Du siehst, mein Sohn,
zum Raum wird hier die Zeit.*
Richard Wagner, Parsifal, Acte I

*Die Hunde auf dem Hof erkennen
mich, und meine Schwester nicht?*
Hugo von Hofmannsthal, Elektra

AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair al Dr. Matias-Guiu tot el suport que m'ha donat, no solament alhora de fer aquest treball, sinó també al llarg d'aquests darrers anys, en encomanar-me la responsabilitat de l'àrea de patologia oncològica colo-rectal. Moltes gràcies, doncs, per la confiança dipositada en mi i per les tasques i experiències que hem compartit junts, tant a nivell assistencial com acadèmic.

A la Dra. Salud, co-directora, companya en el dia a dia hospitalari, companya de formació en la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida i ara també en les tasques acadèmiques en la mateixa facultat. Moltes gràcies, Antonieta, per haver participat en aquest treball de forma tan generosa i incondicional.

Vull deixar constància molt especialment de la generositat i sincera dedicació de la Dra. Montse Rué en el que es refereix al tractament de les dades estadístiques. Sense la seva col·laboració una part important d'aquest treball difícilment l'hagués pogut dur a terme. Una persona d'una qualitat humana excepcional que, a més a més, m'ha sabut transmetre coneixements que ja tenia oblidats. Moltes gràcies de tot cor, Montse!

Als membres de la secció de Cirurgia Colo-Rectal, especialment al Dr. Enrique Sierra i el Dr. Antonio Fermiñán, per la col·laboració incondicional que ha facilitat molt la realització de gran part d'aquest treball.

A la Yuko Saruta i els seus companys de l'equip de Sysmex, una gran ajuda en l'aplicació de la tècnica OSNA.

Als meus companys del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, a tots sense excepció, però especialment als que m'han ajudat en petits detalls que m'han fet aquesta

tasca una mica menys feixuga, com són l'Ana Velasco, la Dolors Cuevas i la Maria Santacana. A totes tres, molt agraït.

I una persona no és mai completa sense els seus amics que, encara que directament no han participat en aquesta feina, sempre he sentit el seu suport, el seu calor i la seva confiança. Moltes gràcies José Mari, Pilar, Roser i Albert. Moltes gràcies Mariona, Marisa i Montse. Molt agraït a les meves estimades Rosa i Contxita per tots els moments compartits i per insistir tant i tant. I un gran record pel Jordi i l'Antonio, que ja no ho han pogut veure però que estiguin on estiguin se'n alegraran, n'estic segur!

RESUMEN

RESUMEN

El cáncer colorrectal es el tercer tumor maligno en frecuencia a nivel mundial (después de pulmón y próstata en hombres y de mama y pulmón en mujeres) ocupando aproximadamente un 10% de los casos nuevos anuales de cáncer. De igual manera, es el tercer tipo de cáncer en frecuencia en cuanto a mortalidad. La prevalencia es más alta en áreas industrializadas. La incidencia aumenta con la edad, sobre todo a partir de los 40 años, con un pico máximo a los 60-70 años y menos del 20% de los casos se dan antes de los 50. Se ha relacionado con factores como la dieta (baja ingesta de fibras vegetales no absorbibles y elevado consumo de hidratos de carbono refinados y grasas), el estilo de vida (sedentarismo) y la presencia de enfermedades inflamatorias crónicas, especialmente la colitis ulcerosa.

Actualmente se conocen factores pronósticos y predictivos de respuesta en relación con las diferentes vías carcinogénicas.

Entre los **factores pronósticos** el más importante es el estadiaje tumoral, que determinará los diferentes valores de supervivencia en función de la presencia de afectación ganglionar y/o metástasis a distancia. La infiltración de la pared reduce de forma significativa la supervivencia, pero todavía disminuye más cuando hay metástasis ganglionares o en otros órganos. Otro factor pronóstico es la inestabilidad de microsatélites (MSI-H), que conferirá mejor pronóstico en un subgrupo de pacientes con cáncer colorrectal con alteración en las proteínas reparadoras de DNA.

En nuestro estudio valoramos como factor pronóstico el estudio molecular mediante técnica OSNA de la presencia de células tumorales en ganglios linfáticos, que puede suponer una supraestadificación de los tumores respecto a los estudios convencionales que, por lo tanto, conferirá unos

valores de supervivencia diferentes e incluso un manejo terapéutico post-quirúrgico distinto.

Entre los **factores predictivos de respuesta** encontramos una serie de biomarcadores que indicarían una posible respuesta tumoral o resistencia a terapias específicas en función de la vía de carcinogénesis, tipo de fármacos administrados y estado clínico del paciente. Actualmente se utilizan eficazmente una serie de agentes terapéuticos, entre los que se encuentran el 5-fluorouracilo, capecitabina, oxaliplatino, irinotecan, bevacizumab, cetuximab y panitumumab. Estos tres últimos son agentes biológicos (anticuerpos) dirigidos contra componentes específicos vinculados con la carcinogénesis. Entre los biomarcadores que actúan como factores predictivos los más importantes son la mutación de K-Ras y de nuevo la inestabilidad de microsatélites (MSI-H). Los agentes cetuximab y panitumumab son anticuerpos monoclonales que actúan bloqueando el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pero solamente en aquellos pacientes que no tiene mutación de K-Ras, ya que en estos últimos la vía está activada de forma constitutiva y, por lo tanto, cetuximab y panitumumab no la podrán bloquear. Por ello es necesario saber el estado de K-Ras antes de administrar dichos agentes y podemos considerar que el estado mutacional de K-Ras es un factor predictivo de respuesta a dicho tratamiento.

En nuestro estudio valoramos como factor predictivo de respuesta el estado mutacional de K-Ras en una serie de pacientes con cáncer colorrectal comprobando las diferentes respuestas al tratamiento y la progresión de la enfermedad entre los dos grupos.

En cuanto al tratamiento quirúrgico del cáncer de recto, se pueden considerar factores predictivos de respuesta al mismo una serie de parámetros entre los que se encuentran la valoración de la calidad de

resección del mesorrecto, la afectación del margen de resección radial y el grado de respuesta a la terapia neoadyuvante.

En nuestro estudio valoramos como factor predictivo de respuesta el control de la calidad de resección de mesorrecto en las piezas de resección quirúrgica de cáncer de recto, parámetro que puede tener valor de cara a predecir futuras recidivas una vez realizado el tratamiento quirúrgico. De igual manera se puede valorar también la afectación circunferencial. Respecto a este aspecto, nuestro estudio forma parte de un proyecto nacional multicéntrico y multidisciplinar de valoración de la calidad de resección de mesorrecto y presencia de recidivas. Algunos de estos pacientes han sido, a su vez, sometidos a tratamiento neoadyuvante antes de la cirugía. En este subgrupo creemos que el establecimiento del grado de regresión tumoral en estos casos con tratamiento neoadyuvante puede tener un valor predictivo en cuanto a la progresión de la enfermedad.

ABSTRACT

Colorectal carcinoma ranks as the third most frequent cancer in men (after lung and prostate) and in women (after cancers of the breast and uterine cervix). Higher rates occur in industrialized countries. Incidence rates are rising in many countries, according to the age. Carcinoma is rare before the age of 40 years, except patients with genetic predisposition. Lifestyle, dietary and environmental factors are relevant risk factors. It can be associated with chronic inflammatory bowel diseases, such as ulcerative colitis.

Nowadays it has been reported prognosis and predictive factors related to carcinogenetic pathways.

Among the **prognosis factors**, the most important is tumour staging, in which the survival rate is related to the invasion of lymph nodes and the distant metastasis. Lymph node metastasis is a key prognosis factor in colorectal carcinoma. It associates to local recurrence and to a low rate of survival in the first 5 years of follow-up. Another prognosis factor is the microsatellite instability (MSI). Tumours with MSI-H are more responsive to certain chemotherapies and have better prognosis. In our study we have detected CK19 mRNA in lymph node with a new diagnostic system: one-step nucleic amplification (OSNA) in order to assess whether histopathological pN0 patients can be upstaged. In 100 colon cancer patients in stage I or II, the OSNA method upstaged 25% of cases to stage III. OSNA is a feasible method and we have got an “ex vivo” protocol for identifying sentinel lymph nodes with a high rate of specificity.

Among the **predictive factors**, we have biomarkers that indicate likelihood of tumour response or resistance to therapies depending on the carcinogenic pathway. Nowadays we have some therapeutic agents against colorectal cancer such are 5-fluorouracil, capecitabine, oxaliplatin,

irinotecan, bevacizumab, cetuximab and panitumumab, including the later three targeted antibodies. Cetuximab and panitumumab are anti-EGFR antibodies that block ligand and produce response in colorectal cancer. Mutation in downstream K-Ras leads to constitutive activation and this tumour is unresponsive to anti-EGFR antibodies. This is the reason why the most important predictive factor of tumor response is the K-Ras mutation, which if is it negative allows this patient to be treated with targeted antibodies In 200 patients with metastatic colon cancer 12Ser and 12Cys mutations associate to higher level of mortality and either high grade tumors or variants of tumors other than conventional adenocarcinoma associate to poor survival rate.

On the other hand, in rectal cancer, other predictive factors are the quality of the mesorectal excision surgery, the involved circumferential margin and the tumor regression if is treated. These factors are related to recurrence and survival. In 200 rectal cancer specimens in our study we have found that there is a strong association between the quality of the mesorectal excision and cancer progression, and also with the survival rate.

RESUM

El càncer colorrectal és el tercer tumor maligne en freqüència a nivell mundial (després del pulmó i pròstata en homes i de mama i pulmó en dones) amb aproximadament un 10% dels casos nous anuals de càncer. D'igual manera, es el tercer càncer en freqüència quant a mortalitat. La prevalença és mes alta en àrees industrialitzades. La incidència augmenta amb l'edat, sobre tot a partir dels 40 anys, amb un punt màxim als 60-70 anys i menys del 20% dels casos es donen abans dels 50. S'ha relacionat amb factors com la dieta (baix consum de fibres vegetals no absorbibles i elevada ingesta d'hidrats de carboni refinats i greixos), l'estilo de vida (sedentarisme) y la presencia de malalties inflamatòries cròniques, especialment la colitis ulcerosa.

Actualment es coneixen factors pronòstics i predictius de resposta en relació amb les diferents vies carcinogenètiques.

Entre els **factors pronòstics** el més important és l'estadiatge tumoral, que determinarà els diferents valors de supervivència en funció de la presència d'afectació ganglionar i/o metàstasis a distància. La infiltració de la paret redueix de forma significativa la supervivència, però encara disminueix més quan hi ha metàstasis ganglionars o en altres òrgans. Un altre factor pronòstic és la inestabilitat de microsatèlits (MSI-H), cosa que conferirà millor pronòstic en un subgrup de pacients amb càncer colo-rectal amb alteració en les proteïnes reparadores de DNA. En el nostre estudi valorem com a factor pronòstic l'estudi molecular mitjançant tècnica OSNA de la presència de cèl·lules tumorals en ganglis limfàtics, cosa que pot suposar

una supraestadificació dels tumors respecte als estudis convencionals i que, per tant conferirà uns valors de supervivència diferents i inclús una terapèutics postquirúrgica diferent.

Entre els factors predictius de resposta hi ha una sèrie de biomarcadors que indicarien una possible resposta tumoral o resistència a teràpies específiques en funció de la via de carcinogènesi, tipus de fàrmacs administrats i estat clínic del pacient. Actualment s'utilitzen de forma eficaç una sèrie d'agents terapèutics, entre els quals hi ha el 5-fluorouracil, capecitabina, oxaliplatí, irinotecan, bevacizumab, cetuximab i panitumumab. Aquests tres darrers són agents biològics (anticossos) dirigits contra components específics vinculats amb la carcinogènesi. Entre els biomarcadors que actuen com a factors predictius els més importants són la mutació de K-Ras i de nou la MSI-H. Els agents cetuximab i panitumumab són anticossos monoclonals que actuen bloquejant el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) però solament en aquells pacients que no tenen la mutació de K-Ras, ja que en aquests últims la via està activada de forma constitutiva i, per tant cetuximab i panitumumab no la podran bloquejar. Per això és necessari conèixer l'estat mutacional de K-Ras abans d'administrar aquests fàrmacs i podem considerar que l'estat mutacional de K-Ras és un factor predictiu de resposta a aquest tractament.

En el nostre estudi valorem com a factor predictiu de resposta l'estat mutacional de K-Ras en una sèrie de pacients amb càncer colo-rectal comprovant les diferents respostes al tractament i la progressió de la malaltia entre els dos grups.

En quant al tractament quirúrgic de càncer de recte, es poden considerar factors predictius de resposta al mateix una sèrie de paràmetres en els què es troben la valoració de la qualitat de resecció del mesorrecte, l'afectació del marge de resecció radial i el grau de resposta a la teràpia neoadjuvant.

En el nostre estudi valorem com a factor predictiu el control de la qualitat de resecció del mesorrecte en les peces de resecció quirúrgica de càncer de recte, paràmetre que pot tenir valor de cara a predir futures recidives un cop realitzat el tractament quirúrgic. D'igual manera es pot valorar també l'afectació circumferencial. Respecte a això, el nostre estudi forma part d'un projecte nacional multicèntric i multidisciplinari de valoració de la qualitat de resecció del mesorrecte i presència de recidives. Alguns d'aquests pacients han estat també sotmesos a tractament neoadjuvant previ a la cirurgia. En aquest subgrup creiem que el fet d'establir el grau de regressió tumoral pot tenir un valor predictiu quant a la progressió de la malaltia.

ABREVIATURAS

ADC: Adenocarcinoma

ADC NOS: Adenocarcinoma convencional

CK19: Citoqueratina 19

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGF: Factor de Crecimiento Epitelial

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial

ERK: Extracellular signal regulated kinase

GC: Ganglio centinela

GDP: Difosfato de guanosina

GNC: Ganglio no centinela

GnEF: guanine nucleotide exchange factor

GR: Grado de regresión tumoral

GTP: Trifosfato de guanosina

HIQ: Inmunohistoquímica

HR: Hazard-Ratio

IC: Intervalo de confianza

IIQ: Intervalo intercuartílico

MEK: Mitogen/extracellular-signal-regulated kinase

mRNA: RNA mensajero

MSI: Inestabilidad de microsatélites

NA: No disponible

NI: No informado

OSNA: One-step nucleic acid amplification

p: Grado de significación estadística

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PI3K: Proteína fosfatidilinositol-3-quinasa

Qt_: Quimioterapia

Rt_: Radioterapia

RL: Recurrencia local (recidiva)

RNA: Ácido ribonucleíco

RTK: Receptor tirosin-quinasa

SG: Seguimiento

SOS: Proteína “son of sevenless”

UICC: International Union Against Cancer

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
OSNA Y GANGLIO CENTINELA EN CANCER DE COLON	1
EL GEN K-Ras EN CÁNCER DE COLON	7
Funciones de K-Ras	10
Vía de señalización de Ras	11
Ras y cáncer	12
Activación de oncogenes en cáncer de colon	16
Mutación de K-Ras e inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en cáncer colorrectal	19
FACTORES PRONÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS DE CÁNCER DE RECTO	24
Proyecto de cáncer rectal español	27
<u>Centros y criterios de inclusión</u>	27
<u>Definiciones y consensos</u>	29
Definiciones generales	29
Complicaciones del tratamiento	31
Anatomía patológica	32
Clasificación	32
Calidad de resección del meso-recto	35
Calidad de resección del canal anal	36
Margen de resección radial	37
Tumor residual	37
Grado de regresión tumoral	40
<u>Registro de datos</u>	41

<u>Seguimiento</u>	42
<u>Tratamiento neoadyuvante</u>	
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
3. MATERIAL Y MÉTODOS	49
OSNA Y GANGLIO CENTINELA	51
Pacientes	51
Diseño del estudio	53
Procesamiento de los ganglios linfáticos	54
Histopatología e inmunohistoquímica con CK19	57
One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA)	59
Análisis estadístico	60
ESTUDIO DEL GEN K-Ras	61
Selección de casos	61
Análisis de K-Ras	62
Análisis estadístico	63
FACTORES PRONÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS	63
Selección de casos	63
Estudio radiológico	65
Tratamiento oncológico	66
Protocolo quirúrgico	66
Estudio de Anatomía Patológica	68
Seguimiento	69
Análisis estadístico	70
4. RESULTADOS	71
OSNA Y GANGLIO CENTINELA	73
Características del paciente e histopatología tumoral	73
Disección de ganglios linfáticos	76
Análisis molecular con el método OSNA	77
Mapeo para la detección de ganglio centinela “ex vivo”	79
ESTUDIO DEL GEN K-Ras	82
Resultados globales	82
Resultados respecto a la presencia de metástasis	86
Resultados respecto a la supervivencia	88

FACTORES PRONÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS	94
<u>Resultados globales</u>	94
Radiología	95
Tratamiento oncológico	96
Protocolo quirúrgico	96
Estudio de la pieza quirúrgica (Anatomía patológica)	97
Seguimiento	99
<u>Resultados estadísticos</u>	99
Recidiva local	99
Metástasis	102
Supervivencia	106
5. DISCUSIÓN	113
OSNA Y GANGLIO CENTINELA	115
ESTUDIO DEL GEN K-Ras	121
FACTORES PRONÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS	123
6. CONCLUSIONES	129
7. BIBLIOGRAFÍA	133

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Según datos de la Asociación Española Contra el Cáncer, el cáncer colorrectal es el tercer tumor maligno más prevalente entre los hombres en países desarrollados (tras los tumores de pulmón y próstata), y el segundo entre las mujeres (tras el cáncer de mama), con una incidencia aproximada de 1.000.000 de nuevos casos al año en todo el mundo (550.000 hombres y 470.000 mujeres). Representa el 9,5% de todos los tumores malignos, y muestra además una clara tendencia al alza desde finales del siglo pasado.

En España se diagnostican unos 22.000 casos anuales, lo que representa el 12,7% de los tumores del sexo masculino (12.500 casos) y el 15% de los femeninos (9.500 casos). La incidencia en nuestro país se puede considerar alta en ambos sexos y su tendencia es a aumentar, especialmente en el grupo de pacientes de sexo masculino. Aproximadamente un 54 % de los pacientes que sufren un cáncer colorrectal en España sobreviven más de 5 años. En España fallecen unas 12.500 personas al año por su causa, 7.000 hombres (el 11,7% de todas las muertes por cáncer y el 3,6 % del total de muertes), y 5.500 mujeres (el 15% de las muertes por cáncer y el 2,9% del total de muertes). Es la segunda causa de muerte por cáncer en nuestro país y la principal causa de mortalidad en el conjunto de todas las enfermedades gastrointestinales

1.- OSNA Y GANGLIO CENTINELA EN CANCER DE COLON

Las metástasis en ganglios linfáticos es uno de los factores pronósticos más importantes en el cáncer colorrectal, asociándose a una elevación de los índices de recurrencia loco-regional así como una disminución de las cifras de supervivencia a los 5 años (Croner et al, 2009; Kennedy et al, 2011;

Merkel et al, Cancer 2001). Por este motivo, la quimioterapia adyuvante representa el tratamiento de elección en pacientes diagnosticados de cáncer de colon con ganglios linfáticos positivos (estadío III según UICC). La aplicación del tratamiento adyuvante aumenta la supervivencia global a los 8 años en aproximadamente un 10% de estos casos (Sargent et al, 2009).

Se ha constatado que algunos subgrupos de tumores con ganglios linfáticos negativos (estadío II según la UICC) presentan un peor pronóstico que los propios tumores clasificados como estadío III de la UICC. De este modo, se han descrito casos de pacientes con tumores clasificados como pT4N0 que han tenido una supervivencia a los 5 años inferior si los comparamos con tumores pT1-2N1. Por otra parte, el índice de recurrencia en pacientes con cáncer de colon en estadío III asciende hasta un 20% después de una resección completa (R0) (Kennedy et al, 2011; Croner et al, 2010; Salazar et al, 2011). Sin embargo, el tratamiento adyuvante en líneas generales no está indicado en cáncer de colon en estadío II UICC (Merkel et al, Col Dis 2001). Por todo ello se ha planteado la existencia de pacientes de alto riesgo que presentan tumores con ganglios linfáticos negativos y, consecuentemente, se debate cómo estos pacientes podrían ser identificados para un tratamiento postquirúrgico adecuado. Recientemente, para seleccionar estos casos, se han identificado una serie de marcadores moleculares que permitirían clasificar este grupo de casos de alto riesgo dentro de los tumores primarios (Sargent et al, 2009; Salazar et al, 2011; Gray et al, 2011; Meyer et al, 2009; Rosenberg et al, 2002). Pero hasta el momento ninguno de estos marcadores moleculares se ha introducido en la rutina clínica.

Un enfoque diferente para identificar pacientes en estadíos I y II que podrían beneficiarse de la terapia adyuvante sería un estudio en profundidad de los ganglios linfáticos clasificados como libres de metástasis en los análisis de rutina en la Hematoxilina-Eosina.

Recientemente se ha descrito el impacto en el pronóstico que representan los depósitos tumorales de menos de 2 mm de diámetro máximo detectados a través de técnicas moleculares en pacientes con cáncer de colon en los que, tras el análisis histopatológico de rutina, no presentaban ganglios linfáticos metastáticos. De hecho, en la última clasificación del TNM de la UICC (2009) se asume que estos nódulos tumorales extramurales son ganglios linfáticos totalmente ocupados por la metástasis y se clasifican como N1c, con lo que pasan a estadificarse como estadio III. El estudio exhaustivo del ganglio linfático implicaría la realización de cortes seriados del bloque de parafina y el estudio inmunohistoquímico de los mismos para detectar la presencia de células tumorales mínimamente representadas en los cortes de Hematoxilina-Eosina (H/E). Sin embargo, estos procedimientos no se llevan a cabo de forma habitual en el estudio de las piezas quirúrgicas y la mayoría de los patólogos analizan un único corte de ganglio linfático teñido con H/E. Como consecuencia, pequeños depósitos tumorales infiltrando ganglios linfáticos por fuera de la línea de sección media podrían no ser detectados durante el estudio histopatológico dando lugar a una infraestadificación de estos pacientes quienes, a resultas de todo ello, no serían candidatos a tratamiento oncológico adyuvante (Davies et al, 2008; Iddings et al, 2006).

En 2010 se describió una técnica molecular para el estudio de las metástasis en ganglios linfáticos, tanto en cáncer de mama como de colon. El OSNA (One-step Nucleic Acid Amplification) permite amplificar mRNA directamente de los lisados tisulares de forma isotérmica y se ha desarrollado para proporcionar una medida cuantitativa de la expresión de mRNA de citoqueratina 19 (CK19). De esta manera se pueden identificar correctamente metástasis ganglionares en carcinomas de mama y colorrectales (Croner et al, 2010; Yamamoto et al, 2013; Cserni et al, 2012; Guller et al, 2012).

Por otra parte, el concepto de “Ganglio Centinela” está basado en la premisa de que el drenaje linfático de los tumores se inicia a través de un número pequeño de ganglios linfáticos próximos al tumor primario y que supondrían el primer paso en la progresión tumoral. A estos se les ha llamado “ganglios centinela” (GC). Si esto es así, el estudio de los ganglios centinela es predictivo del estado del resto de los ganglios, es decir, un ganglio centinela negativo indicaría que el tumor no ha iniciado un proceso metastásico (y por tanto, se podría clasificar al paciente como N0, de acuerdo con la clasificación TNM), en tanto que un centinela positivo sería indicador de que se ha iniciado dicho proceso.

El concepto de ganglio centinela se ha validado en estudios de melanoma y cáncer de mama (Osako et al, 2011), en los que se aplica de manera rutinaria para la toma de decisiones sobre el tipo de cirugía a aplicar.

A diferencia de estos tumores, en el caso del cáncer de colon el objetivo no sería utilizar el resultado del ganglio centinela para decidir la extensión de la resección quirúrgica o la extracción de ganglios linfáticos, sino permitir un estudio más preciso y rápido de los ganglios extraídos y mejorar el estadiaje de los pacientes (Wanebo et al, 2012; Viehl et al, 2012).

En la actualidad, cada ganglio de un paciente con cáncer de colon se estudia mediante un corte teñido con Hematosilina – Eosina. Como se ha comentado más arriba, entre un 20 y un 30% de los pacientes con ganglios negativos (estadios I y II según la clasificación de la AJCC) desarrollan progresión de su enfermedad con recidivas loco-regionales o metástasis a distancia dentro de los 5 años posteriores a la resección quirúrgica. Estos pacientes se designan como pN0 y por lo tanto no reciben tratamiento adyuvante. Se ha sugerido que en la histología estándar se podría haber pasado por alto micrometástasis ganglionares ocultas (Iddings et al, 2006; Davies et al, 2008), ya que el proceso histopatológico rutinario evalúa menos del 1% de la totalidad del ganglio. De hecho se han presentado

estudios donde se han descrito micrometástasis en ganglios centinela que no fueron detectadas por IHQ (Bilchik et al, 2002). Como consecuencia, estos pacientes pueden haber sido infraestadiados y el tratamiento adyuvante podría serles beneficioso (Bilchik et al, 2003).

La utilización sistemática de técnicas ultrasensibles (IHQ extensiva, o técnicas moleculares) no parece, hoy en día, una fórmula viable para estudiar todos los ganglios de un paciente, dado el gran número de ganglios a analizar, el coste de estas técnicas y, en el caso de la IHC, la carga de trabajo que eso representa para un servicio de anatomía patológica. No obstante, sí se podrían aplicar estas técnicas a los ganglios centinela, en caso de que se pudiese validar el concepto en los pacientes con cáncer de colon.

2.- EL GEN K-Ras EN CÁNCER DE COLON

Ras es el protooncogén mutado con mayor frecuencia en tumores en seres humanos. Codifica un miembro de una familia de pequeñas proteínas G que unen nucleótidos de guanosina (trifosfato de guanosina GTP y difosfato de guanosina GDP). Las proteínas de unión a GTP Ras son un punto de convergencia fundamental en la vía de señalización de los receptores tirosin-quinasa y forman parte importante de los mecanismos celulares de transducción de señales extracelulares (Campbell et al, 1998). Son moléculas de señalización intracelular unidas a la membrana que participan en una amplia variedad de funciones celulares relacionadas con la proliferación, la señalización y la supervivencia. Modulan respuesta celulares mediadas por factores de crecimiento (ligandos de receptores tirosina-quinasa o receptores acoplados a proteínas G), citocinas, señales de adhesión celular, radiaciones ultravioleta y stress osmótico. Forman una

familia compuesta por 10 proteínas entre las que se incluyen H-Ras, N-Ras, K-Ras, R-Ras, Rap1 (A y B), TC21 y R-Ras3 (Campbell et al, 1998; Boss et al, 1998). Las tres principales isoformas de proteína Ras son H-Ras, N-Ras y K-Ras. H-Ras y K-Ras (K-RasA y K-RasB) se identificaron como oncoproteínas virales (v-Ras) de los virus del sarcoma murino de Harvey y Kirsten respectivamente, mientras que N-Ras se describió en una línea celular de neuroblastoma. H-Ras se expresa principalmente en piel y músculo esquelético. Por otra parte, K-Ras se expresa sobre todo en colon y timo, mientras que N-Ras lo hace en tejido germinal masculino y timo. Las proteínas Ras se sintetizan en el citoplasma y se asocian a la capa interna de la membrana plasmática a través de modificaciones post-traducción incluyendo una forma de lipidación de ácidos grasos, la isopentilación, en Cys-186.

La proteína Ras alterna dos conformaciones estructurales: un estado inactivo unido a GDP y uno activo unido a GTP. Ras pasa continuamente de un estado excitado de transmisión de señales a uno quiescente. Para la activación de Ras es necesario el reclutamiento hacia la membrana de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GnEF: guanine nucleotide exchange factor) en respuesta a factores de crecimiento (como EGF y PDGF) y la subsiguiente activación de proteína-quinasas. El GnEF desencadena la liberación de GDP de la proteína Ras, asegurándose su unión de Ras a GTP debido a la relativa abundancia intracelular de ésta última comparándola con GDP (figura 1).

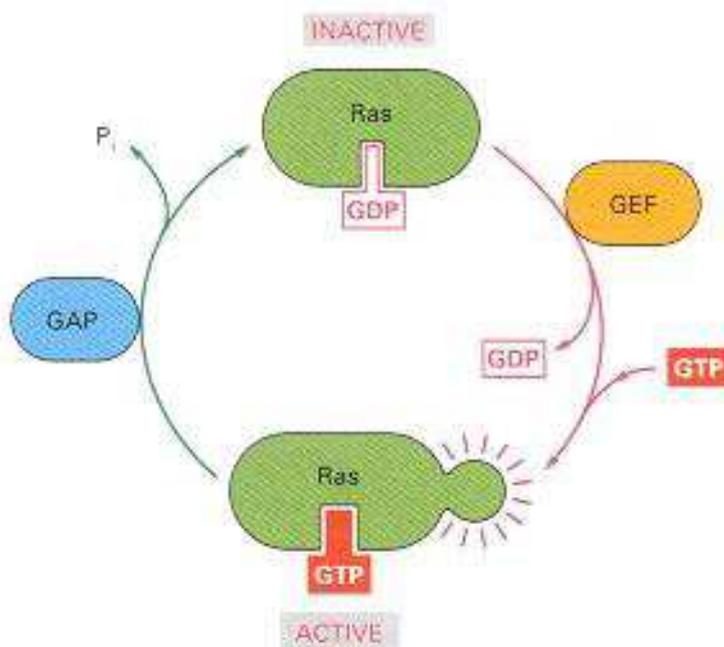


Figura 1: Activación de proteína Ras (Alberts et al, 2002).

Un ejemplo de factor de intercambio de guanina (GnEF) es la proteína SOS (son of sevenless) que, a través de su unión con la proteína adaptadora Grb2, es atraída hacia la membrana (Buday et al, 1993). Grb2 contiene un dominio src-homólogo 2(SH2) que se une a receptores tirosina-quinasa (RTK), incluyendo los receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) y el factor de crecimiento epidérmico (EGFR). También tiene dos dominios SH3 que median su unión a SOS (figura 2).

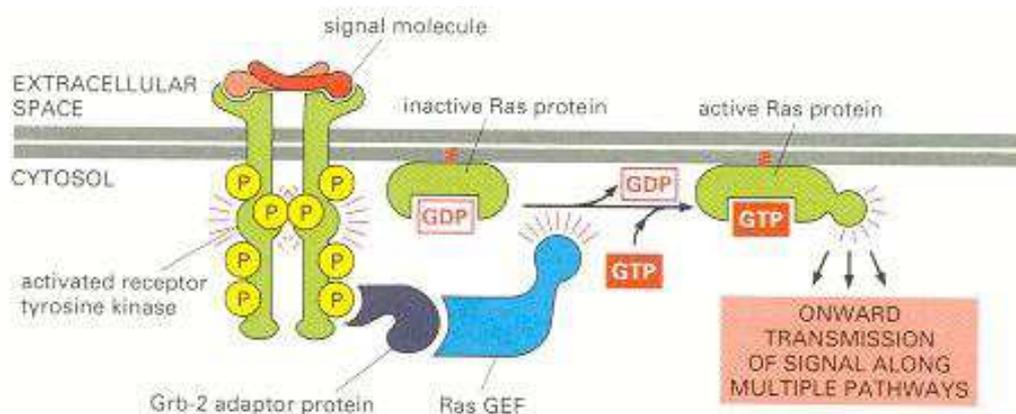


Figura 2: Participación de Grb2 en la activación de proteína Ras (Alberts et al, 2002).

Alternativamente, otra proteína adaptadora, Shc, puede unirse al componente citoplasmático del receptor a través de su dominio SH2 dando lugar a la fosforilación de tirosina y la consiguiente unión de Grb2. Una vez el SOS está translocado a la membrana promueve la liberación de GDP del Ras, permitiendo al GTP unirse a la proteína Ras y activarla. La fase de excitación de emisión de señales dura poco. Una vez activada, son necesarias proteínas activadoras de GTPasa (GAP) para hidrolizar la GTP, con lo que se libera un grupo fosfato y vuelve la proteína a su estado quiescente de unión GDP. Así pues, las proteínas GAP son reguladoras negativas de las funciones de Ras (Wittinghofer et al, 1997). Se han identificado muchas proteínas GAP que interaccionan con Ras, entre ellas p120GAP, NF1-GAP/neurofibromina y GAP1^m. De particular interés es la NF1 ya que se encuentra frecuentemente mutada en pacientes neurofibromatosis tipo I.

Funciones de Ras

Ras tiene multitud de funciones que difieren dependiendo de factores como el tipo de célula y el microambiente extracelular. Es paradójico que un único gen pueda ser capaz de iniciar el ciclo celular y la síntesis de DNA en unas células (fibroblastos) y, en cambio, dar lugar a diferenciación terminal en otras, como las líneas celulares PC12 (Santos et al, 1989). En otras células como los mioblastos Ras se opone al freno del ciclo celular y diferenciación hacia miotúbulos y regula a la baja la expresión de mRNA músculo específico. Por otra parte se ha demostrado que Ras favorece la supervivencia celular en algunos tipos celulares como son células hematopoyéticas en ausencia de citocinas y líneas PC12 y neuronas del sistema nervioso simpático en ausencia de factor de crecimiento neural u otros factores tróficos (Klese et al, 1998). Aunque Ras es mediadora de importantes funciones celulares como son la proliferación, la supervivencia

y la diferenciación, la contribución exacta de las isoformas H, N y K no está clara.

Vía de señalización de Ras

La proteína Ras activada estimula los reguladores de proliferación distales a través de dos vías diferentes que convergen en el núcleo a través de señales que estimulan la proliferación celular. Estas vías son la de la proteína Raf y la de la proteína fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K).

El efector más conocido de Ras es la serin/treonin quinasa Raf (figura 3). La proteína Raf se une a Ras siendo indispensable para funciones de Ras como la transformación celular. Hay 3 isoformas de Raf en mamíferos: A, B y C Raf (esta última también conocida como Raf-1) (Wellbrock et al, 2004). C-Raf es ubicuo en su expresión tisular mientras que la expresión de A-Raf y B-Raf está más restringida. La activación de Raf mediada por Ras requiere la unión a dos regiones de esta quinasa citoplasmática, situadas ambas en la región amino-terminal.

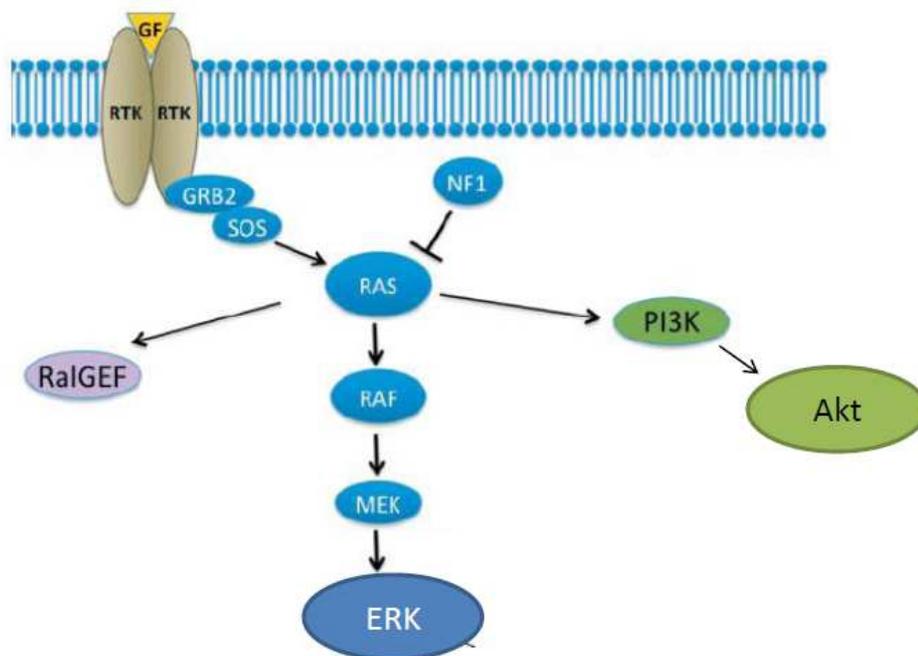


Figura 3: Vías de señalización de la proteína Ras (Vakiani et al, 2011).

Para la activación completa de Raf son claves varios fenómenos de fosforilación en ambos residuos tirosina y serin/treonina. Además hay claras diferencias entre los sitios de fosforilación entre B-Raf y C-Raf, indicando que la regulación de la activación de estas dos isoformas puede diferir significativamente. La proteína Raf actúa como un dímero y la formación de estos dímeros provoca un aumento de su actividad quinasa basal.

Una vez activada, Raf puede fosforilar la quinasa MEK (mitogen/extracellular-signal-regulated kinase) produciendo su activación (figura 3). Existen dos isoformas de MEK: MEK-1 y MEK-2, ambas expresadas de forma ubicua, con una identidad de secuencias de aproximadamente un 80%. Una vez activada, MEK puede a su vez activar la MAP quinasa, también llamada ERK (extracellular signal regulated kinase). Hay dos isoformas ERK (1 y 2) expresadas ubicuamente y con secuencias similares. Estas proteínas pueden, a su vez, translocarse al núcleo, donde a través de fosforilaciones de serina o treonina pueden activar una serie de proteínas, muchas de ellas factores de transcripción.

Aparte de la regulación positiva de la vía MAP quinasa mediante fosforilación, hay mecanismos reguladores negativos que atenúan la activación de esta cascada. Una de las principales formas de regulación negativa es a través de las fosfatasas, la mayoría de las cuales tiene doble especificidad, es decir, que pueden defosforilar tanto residuos de serina/treonina como de tirosina. Esto concuerda con el hecho de que ERK debe ser fosforilado en ambos residuos (treonina y tirosina) para conseguir su máxima activación.

Ras y cáncer

A partir del descubrimiento de los retrovirus transformadores del sarcoma de Harvey y Kirsten, se tuvo evidencia de la implicación de Ras en el

cáncer. Estos virus contenían oncogenes derivados de H-Ras y K-Ras. Los primeros oncogenes humanos se identificaron por transferencia de DNA genómico desde líneas celulares de tumores humanos a fibroblastos de ratón NIH3T3 y aislando fragmentos de DNA en los focos transformados. Estos resultaron ser los homólogos humanos de los genes ras virales (Barbacid, 1987). Estudios posteriores mostraron que Ras está oncogénicamente activado en un 15% de todos los tumores humanos, y en algunos cánceres como el carcinoma pancreático en hasta el 90% (Bos et al, 1989). Por otra parte, la proteína Raf se encuentra mutada en un 7 % de los tumores malignos (figuras 4 y 5).

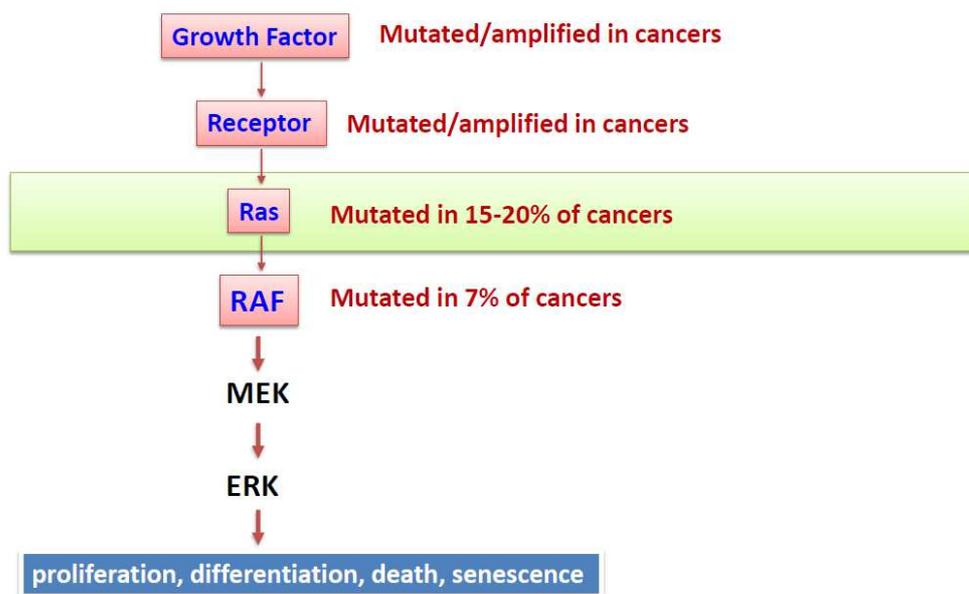


Figura 4: Alteraciones de la vía Ras-MAPK en cáncer humano.

Cancer type	HRAS	KRAS	NRAS	BRAF
Biliary tract	0%	33%	1%	14%
Bladder	11%	4%	3%	0%
Breast	0%	4%	0%	2%
Cervix	9%	9%	1%	0%
Colon	0%	32%	3%	14%
Endometrial	1%	15%	0%	1%
Kidney	0%	1%	0%	0%
Liver	0%	8%	10%	3%
Lung	1%	19%	1%	2%
Melanoma	6%	2%	18%	43%
Myeloid leukaemia	0%	5%	14%	1%
Ovarian	0%	17%	4%	15%
Pancreas	0%	60%	2%	3%
Thyroid	5%	4%	7%	27%

Figura 5: Porcentajes de las mutaciones de Ras y Raf en tumores malignos. (Schubbert et al, 2007)

La proteína Ras se activa, principalmente, como consecuencia de mutaciones puntuales en los residuos de aminoácidos que se encuentran en el bolsillo de unión al GTP o en la región enzimática esencial para la hidrólisis del GTP. Ambos tipos de mutaciones interfieren en este último proceso, que es esencial para inactivar la proteína Ras. Entonces esta proteína se queda atrapada en su forma activa unida a un GTP que no se ha hidrolizado y la célula entra en un estado de proliferación continuada. Las tres principales proteínas Ras comparten una alta homología en los primeros 165 aminoácidos pero muestran diferencias en los 25 aminoácidos de la región c-terminal. Se han encontrado mutaciones en tumores humanos en los codones 12, 13 del exón 2, 59 y 61 del exón 3 y 117 y 146 del exón 4, tanto de K-Ras como de N-Ras, siendo las más frecuentes las de los codones 12 y 61 (Bos et al, 1989). La figura 6 refleja las principales

sustituciones de aminoácidos en las posiciones 12, 59 y 61 en las proteínas de la familia Ras en los principales tumores malignos.

Ras gene	amino acid position			Tumor
	12	59	61	
c-ras (H, K, N)	Gly	Ala	Gln	normal cells
H-ras	Gly	Ala	Leu	lung carcinoma
	Val	Ala	Gln	bladder carcinoma
K-ras	Cys	Ala	Gln	lung carcinoma
	Arg	Ala	Gln	lung carcinoma
	Val	Ala	Gln	colon carcinoma
N-ras	Gly	Ala	Lys	neuroblastoma
	Gly	Ala	Arg	lung carcinoma

Figura 6: Sustituciones de aminoácidos en Ras en tumores malignos.

La mayoría de estas mutaciones disminuyen el nivel de hidrólisis de GTP y también hacen que Ras sea menos sensible a la hidrólisis de GTP mediada por GAP. Por ello el resultado es una molécula Ras predominantemente unida a GTP, constitutivamente activa y capaz de activar las vías de señalización sin necesidad de estimulación por el factor de crecimiento. Este Ras oncogénico es capaz de transformar fibroblastos de ratón inmortalizados o células epiteliales (Barbacid, 1987). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que Ras por sí solo es incapaz de transformar fibroblastos humanos o de primarios de ratón y en lugar de ello someten a las células a una detención permanente del crecimiento, la llamada “senescencia replicativa”. Este fenómeno parece depender de la función de ciertos genes como la p16 y la p53, que actúan como genes supresores de

tumores (Serrano et al, 1997). La inactivación de estos genes supresores de tumores juega un papel clave en el desarrollo del cáncer. De hecho la inactivación de p53 y p16^{INK4a} permite a Ras transformar esas mismas células, cosa que podría explicar la presión selectiva para la inactivación de esos genes supresores en tumores que contienen mutaciones oncogénicas de ras.

No sólo es el propio gen Ras el que está mutado o sobreexpresado en cáncer, sino que en ocasiones son las proteínas reguladoras de Ras las que pueden estar afectadas. El mejor ejemplo sería el NF1, proteína GAP mencionada más arriba. La transmisión hereditaria de un alelo defectuoso de NF1 predispone al individuo a una enfermedad genética, la neurofibromatosis de tipo 1 o neurofibromatosis de von Recklinghausen (Cichowski et al, 2001). Las mutaciones somáticas provocan la inactivación del segundo alelo dando lugar al desarrollo de la neoplasia. La neurofibromatosis se manifiesta con la presencia de múltiples tumores benignos (neurofibromas) y dichos pacientes tienen un riesgo elevado de tumores malignos de la cresta neural. Las células con un NF1 defectuoso acumulan Ras intracelular en su estado de unión a GTP, y por tanto muy activo (Cichowski et al, 2001). Otro ejemplo sería las mutaciones activadoras de SOS, que provocarían un estado hiperactivo de Ras con la consiguiente transformación neoplásica. Otros miembros de la familia Ras de las proteínas unidas a GTP también pueden causar transformación neoplásica. Éstas son R-Ras, TC21/R-Ras2 y R-Ras3.

Activación de oncogenes en cáncer de colon

La familia Ras de pequeñas proteínas G interviene en vías moleculares iniciadas por factores de crecimiento. Sus tres miembros principales (K-Ras, H-Ras y N-Ras) están frecuentemente alterados por mutaciones somáticas en varios tipos de tumores animales y humanos. Las mutaciones

en los genes K-Ras se pueden identificar en cerca del 40% de los carcinomas colorrectales (Bos et al, 1987; Forrester et al, 1987; Watanabe et al, 2013). La inmensa mayoría de las mutaciones Ras están presentes en los codones 12 y 13 de K-Ras, de manera que, en pacientes con cáncer colorrectal con K-Ras mutado, cerca del 70% de las mutaciones están en el codón 12 y entre un 5-20% se encuentran en el codón 13 (Watanabe et al, 2013). La mutación puntual más frecuente en K-Ras en cáncer colorrectal en la mayor parte de las series consiste en la sustitución del aminoácido glicina (Gly) por una valina (Val) en el codón 12 del exón 2 (figura 6). Sin embargo en otras publicaciones aparece la sustitución por alanina (Ala) como la mutación más habitual (Bazan et al, 2002) o la sustitución por ácido aspártico (Asp) (Imamura et al, 2012). La mutación más frecuente en el codon 13 consiste en una sustitución de la glicina por ácido aspártico (Asp) (Bazan et al, 2002; Morelli et al, 2012; Imamura et al, 2012).

Se ha comprobado que las mutaciones de Ras contribuyen a la progresión de los adenomas colorrectales aunque no son necesarios para el inicio de la formación de dicho adenoma. En los pólipos adenomatosos la frecuencia de mutaciones K-Ras es claramente dependiente del tamaño y del grado de displasia de la lesión. De manera que solamente un 10% de los adenomas que tienen un tamaño menor de 1 cm muestran mutaciones de K-Ras, mientras que estas mutaciones se observan en cerca del 50% en los adenomas de más de 1 cm.

En algunos estudios se ha sugerido que las mutaciones de k-Ras en el codon 12 estarían relacionados con al vía de diferenciación mucinosa, mientras que las mutaciones en el codon 13 influyen en la evolución clínica del cáncer (Bazan et al, 2002). Es muy significativo el hecho de que las mutaciones en el codon 12 de K-Ras, en especial la 12Val, están asociadas con una mortalidad más alta (Imamura et al, 2012) y con estadios tumorales más avanzados (Li et al, 2015). Series extensas estudiadas han descrito

como factores de riesgo independientes para mutaciones de K-Ras la edad, el sexo y la localización del tumor primario (Watanabe et al, 2013)

También se han descrito significativos niveles de heterogeneidad intratumoral de K-Ras (8% de los casos) y entre tumor primario y metástasis ganglionares (31% de los casos) (Baldus et al, 2010)

Aparte de las mutaciones en los codones 12 y 13 de K-Ras, una pequeña fracción de mutaciones está presente en los codones 59 y 61 (4%) y 117 y 146 (7%) de K-Ras y en los codones 12, 13 (5%) y 59, 61 (6%) de N-Ras (Schwartzberg et al, 2014). No se han descrito mutaciones de H-Ras en tumores colorrectales. Las bases biológicas para el espectro particular de mutaciones de Ras que se observan tumores colorrectales todavía es objeto de debate. Las mutaciones K-Ras se dan tanto en tumores con inestabilidad de microsatélites (MSI-H) como en tumores estables (MSS) así como también en el cáncer de colon hereditario sin poliposis (HNPCC). Sin embargo, el cáncer de colon esporádico (MSI-H) que presenta frecuentemente mutaciones en B-Raf presenta una menor incidencia de mutaciones en K-Ras, ya que las mutaciones en K-Ras y B-Raf son mutuamente excluyentes (Shi et al, 2012).

Estudios genéticos que han conseguido la anulación de alelos mutados para K-Ras en células de cáncer colorrectal avanzado, han demostrado que la inactivación de la actividad K-Ras mutante elimina las propiedades de crecimiento tumoral de las células en estudios “in vitro” y con modelos animales. Las proteínas Ras son reguladores clave en muchas vías de señalización descendente. Por ello no es sorprendente encontrarnos que otros componentes en estas vías están mutados en una proporción de cánceres colorrectales. B-Raf, una proteína-quinasa directamente activada por las proteínas Ras y la cual a su vez activa la familia de proteínas mitógeno-activadas (MAPK), está mutada en un 5% de todos los cánceres colorrectales. Como ya se ha comentado, las proteínas Ras también pueden

activar la vía del fosfatidilinositol-3 fosfato dando lugar a una activación descendente de la proteína-quinasa B/AKT y la consiguiente activación de factores antiapoptóticos descendentes y la vía mTOR, la cual integra la disponibilidad de nutrientes con el crecimiento celular. La formación de fosfatidilinositol-3 fosfato depende de la actividad catalítica de productos génicos del gen PIK3CA. Entre un 13% y un 30% de los cánceres colorrectales presentan mutaciones de este gen. Estudios posteriores demostraron que estas mutaciones activan la actividad quinasa (Samuels et al, 2004).

Mutación de K-Ras e inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en cáncer colorrectal

El EGFR está expresado en la mayoría de cánceres colorrectales y, debido a su localización a nivel de la superficie celular, es una diana muy atractiva. Los anticuerpos monoclonales anti-EGFR cetuximab y panitumumab bloquean la unión del ligando produciendo una importante respuesta en algunos pacientes de cáncer colorrectal, mientras que los inhibidores de tirosina-quinasa de pequeña molécula son inactivos contra este tipo de tumores.

El **cetuximab** es un anticuerpo monoclonal quimérico que reconoce el dominio extracelular del EGFR. Su administración fue ensayada inicialmente en monoterapia en pacientes no seleccionados con cáncer colorrectal avanzado refractario a quimioterapia convencional, con una modesta respuesta que mejoraba si se asociaba a irinotecan o a irinotecan y bevacizumab. En 2008 se demostró que la presencia de mutaciones en K-Ras era un factor predictivo negativo relevante, ya que seleccionaba al 40% de pacientes que no se benefician de los tratamientos dirigidos frente al EGFR. En 2012 se publicó un artículo en el que se apuntaba la posibilidad de que los tumores con mutaciones en 13Asp, las más frecuentes en el

codon 13, podían beneficiarse más del tratamiento con cetuximab que los pacientes con mutaciones en codon 12 (Mao et al, 2012).

El **panitumumab** es un anticuerpo monoclonal totalmente humanizado que también reconoce el dominio extracelular del EGFR. También en 2008 se pudo observar que, en pacientes con K-Ras nativo, el empleo de panitumumab en monoterapia prolongaba significativamente la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global (Amado et al, 2008). Sin embargo, pacientes con mutaciones en los codones 12 o 13 de K-Ras no parece que se beneficien del tratamiento con este anticuerpo (Peeters et al, 2013)

Ensayos clínicos randomizados han asociado de manera convincente las mutaciones de K-Ras con una pobre respuesta a cetuximab y panitumumab (Shi et al, 2012). Las mutaciones activadoras de K-Ras aíslan esta vía de señalización de los efectos de EGFR y hacen que la inhibición de EGFR sea ineficaz. Estudios recientes han demostrado que sólo los tumores sin mutaciones K-Ras (*K-Ras wild type*) muestran respuesta a estos agentes. Así, se ha observado que en pacientes con K-Ras nativo, el empleo de cetuximab en monoterapia prolongaba significativamente la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global con mejores tasa de respuesta (Karapetis et al, 2008). Datos revisados de estudios tanto randomizados como no randomizados sugieren que los pacientes con carcinoma colorrectal cuyos tumores muestran mutaciones de Ras no deberían recibir terapia con anticuerpos monoclonales contra EGFR (Jimeno et al, 2009). Por esta razón, el estudio de la mutación de K-Ras es un factor predictivo de respuesta con el fin de facilitar la selección de los pacientes más apropiados para el tratamiento con anticuerpos anti-EGFR. Las recomendaciones actuales de la American Society for Clinical Oncology (ASCO) es de que todos los pacientes con cáncer colorrectal en estadio IV que son candidatos para terapia anti-EGFR deben ser sometidos a estudio

mutacional de K-Ras en el tejido tumoral. La terapia con anticuerpos anti-EGFR no se recomienda en pacientes cuyos tumores muestran mutación en K-Ras en los codones 12 y 13. Las mutaciones en el codon 61 predicen la ausencia de respuesta a terapia con cetuximab de la misma manera que las mutaciones en los codones 12 y 13. Sin embargo, mutaciones K-Ras en c.38G>A (p.G13D) podrían no influir en la respuesta a terapia anti-EGFR de la misma forma que otras mutaciones en estos mismos codones (De Roock et al, 2010).

Aunque el valor predictivo de respuesta de las mutaciones de K-Ras en terapia con anticuerpos monoclonales anti-EGFR está bien documentada, el valor pronóstico de las mutaciones K-Ras, independientemente del tratamiento, permanece controvertido (Shi et al, 2012). Una larga serie de más de 3.400 pacientes de cáncer colorrectal demostró que solamente la mutación en el codón 12 con la sustitución de glicina por valina, encontrada en un 8,6 % de los casos, tuvo un efecto significativo en la supervivencia global libre de enfermedad (Andreyev et al, 2001). Esta mutación parece tener un efecto negativo más significativo en pacientes con enfermedad en estadio III, comparándolo con enfermos con tumores en estadio II. Estudios posteriores han postulado que las mutaciones de K-Ras en cáncer colorrectal avanzado se asociaban con peor pronóstico (Richman et al 2009). Sin embargo, múltiples análisis retrospectivos a partir de grandes estudios randomizados no han podido confirmar este hallazgo, incluyendo estudios donde no se ha visto diferencia respecto al status mutacional en pacientes que recibieron el tratamiento adecuado.

Otra familia de anticuerpos monoclonales en los que se está estudiando su relación con el estado mutacional de K-Ras son los fármacos antiangiogénicos. Es el caso del **bevacizumab**. Éste se une de forma selectiva al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), localizado en las paredes vasculares. Cuando el bevacizumab se une al

VEGF, bloquea su función, con lo que previene el crecimiento del tumor al bloquear el crecimiento de los vasos sanguíneos que aportarían los nutrientes y oxígeno necesarios. En pacientes con metástasis (estadío IV), se han publicado estudios recientes en los que los genotipos mutante y *wild-type* no afectan significativamente en los resultados clínicos en dichos enfermos tratados con una primera línea de triple quimioterapia con bevacizumab FIr-B/Fox, aunque los pacientes con enfermedad limitada al hígado sí pueden obtener más beneficio si tienen K-Ras no mutado comparado con pacientes con múltiples metástasis (Bruera et al, 2012). Asimismo, también se ha comprobado que el estado mutacional de K-Ras c.35 G>A se asocia a un peor pronóstico en pacientes con cáncer metastático tratados con FIr-B/Fox como primera línea comparados con enfermos con estado K-Ras/B-Raf nativos y con otras mutaciones diferentes a c.35 G>A (Bruera et al, 2013).

Muchos ensayos clínicos han demostrado el beneficio de la terapia adyuvante en pacientes en estadío III. Sin embargo, en pacientes en estadío II solamente se ha constatado un muy discreto (o nulo) efecto sobre la supervivencia. Sólo se recomienda terapia adyuvante en enfermos en estadío II si estos pacientes presentan factores de alto riesgo: invasión angiolinfática, tumores de alto grado, nivel de invasión T4, obstrucción/perforación o escasos ganglios linfáticos aislados, y aún así la quimioterapia podría no aumentar sustancialmente la supervivencia global. Esto sugiere que únicamente los factores clínico-patológicos podrían no ser suficientes para seleccionar los pacientes para el tratamiento. Por eso se han visto necesarias nuevas herramientas pronósticas que puedan identificar específicamente pacientes en estadío II con un alto riesgo que podrían beneficiarse con la quimioterapia adyuvante.

El papel de la inestabilidad de microsatélites (MSI), y el estatus mutacional de K-Ras y B-Raf como factores predictivos del riesgo de recurrencia y del

beneficio de la quimioterapia ha sido estudiado específicamente en pacientes con cáncer colorrectal en estadio II. Aunque se ha constatado el valor de la MSI como factor predictivo de respuesta a determinados agentes quimioterápicos, el papel pronóstico de Ras y Raf permanece controvertido y parece que ninguna de estas mutaciones, por el momento, son útiles para predecir el beneficio de la quimioterapia en pacientes en estadio II de cáncer colorrectal (Hutchins et al, 2011).

En resumen, podemos afirmar que gracias a la implementación de nuevas herramientas terapéuticas basadas en anticuerpos monoclonales frente al EGFR, el conocimiento del estado mutacional de K-Ras es hoy en día un factor clave para la toma de decisiones terapéuticas debido a su valor predictivo negativo de respuesta al uso de dichos tratamientos. Este hecho ha potenciado la implementación de dichas determinaciones en la mayoría de los servicios de Anatomía Patológica de una manera estandarizada dentro de la práctica asistencial (Hernández-Losa et al, 2012).

En la actualidad, tanto la Agencia de Alimentos y Medicamentos estadounidense (FDA) como la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) requieren el estudio mutacional de K-Ras en cáncer colorrectal antes de administrar anticuerpos monoclonales contra EGFR. Así pues, hoy en día, en la práctica asistencial es necesario conocer, no sólo las posibles mutaciones en los codones 12 y 13 de K-Ras, sino también el estado mutacional del resto de los exones, y no sólo de K-Ras sino también de N-Ras, para lo que es ya imprescindible el estudio mutacional ampliado de K-Ras y N-Ras.

3.- FACTORES PRONÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS DE CÁNCER DE RECTO.

En la práctica médica, uno de los factores pronósticos clave en cuanto al manejo postquirúrgico del cáncer colorrectal viene determinado por el estudio patológico de la pieza quirúrgica. Se ha demostrado que la estadificación y la supervivencia en cáncer colorrectal depende directamente de la calidad del examen patológico de la pieza quirúrgica (Jestin et al, 2005). De este modo, se comprobó que había una enorme variación entre los diferentes servicios de patología en cuanto a la evaluación de los ganglios linfáticos. Esto conllevó a diferencias en la estadificación y la supervivencia de estos pacientes, con lo que se insistió en implementar protocolos para aumentar la precisión en el estudio ganglionar (Lemmens et al, 2006). Múltiples publicaciones corroboraron esta afirmación, no sólo en lo relativo a la disección ganglionar, sino también en cuanto a la evaluación de la resección del mesorrecto en cáncer de recto (Nagtegaal et al, 2002; Smith et al, 2003; Le Voyer et al, 2003; Leibl et al, 2003)

En 2002 la Asociación Española de Cirugía encargó un estudio relacionado con el seguimiento de pacientes tras cirugía oncológica en cáncer colorrectal, en el que estuvieron involucrados 43 centros de salud y universidades de todo el país (Ruiz-López et al, 2002). Dicho estudio mostró que la excisión total del mesorrecto (ETM) se había realizado solamente en el 69% de los pacientes. Sin embargo, hubo una serie de datos que no se estudiaron, como son la recurrencia local (RL), presencia de metástasis e índice de supervivencia.

A continuación, la Asociación Española de Cirugía propuso en 2005 el llamado Proyecto Español de Cáncer de Recto con el fin de tener un registro para el tratamiento del cáncer de recto y para introducir la ETM en

equipos multidisciplinares de cirujanos, patólogos y radiólogos, estableciendo una red de hospitales en España.

En 2006 el grupo director de la Asociación Española de Cirugía inició un proyecto de formación (Codina et al, 2007) inspirado en el Proyecto de Cáncer Rectal de Noruega (Wibe et al, 2002), que había conseguido índices de RL y de supervivencia comparables a muchos centros de excelencia del resto del mundo. Al igual que en este proyecto, la efectividad del programa se midió en función de los datos enviados por cada hospital y centralizados en un centro de registros que posteriormente, una vez analizados, devolvía los resultados a cada equipo participante, junto con los resultados globales a nivel nacional.

Dado que en España no había datos recogidos previamente a este proyecto, y con el fin de ver si los resultados conseguidos por los equipos multidisciplinares eran los adecuados, se decidió comparar los resultados españoles con los de Noruega, considerando que estos últimos eran el “gold standard”. En los objetivos de este estudio estaba el comprobar el efecto de la iniciativa de formación multidisciplinar y auditada en relación a la RL en pacientes con cáncer de recto en los primeros 60 hospitales participantes, incluidos entre 2006 y 2009, y analizar si estos resultados eran comparables a los observados en el Proyecto de Cáncer Rectal de Noruega. Como segundo objetivo estaba el identificar factores de riesgo de RL en esta cohorte de pacientes.

Este proyecto, que fue aceptado por la Asociación Española de Cirujanos, pretendía los siguientes objetivos:

Principales

1. Evaluar los resultados de una técnica normalizada para el tratamiento del cáncer de recto.
2. Evaluar las tasas de recidiva local -independientemente de que se acompañen o no de la presencia de metástasis- y de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años de la operación.
3. Establecer un instrumento de calidad: registro de cáncer de recto, cuya gestión será realizada por la Sección de Gestión de Calidad de la Asociación Española de Cirujanos. Esta, informará a los centros que participen acerca de sus propios resultados y de los resultados del conjunto del estudio. En ningún caso, se suministrarán los datos de los restantes hospitales de forma individualizada a los demás. En principio, este registro debería ser permanente.

Secundarios

1. Valorar la relación entre la invasión del margen circular del mesorrecto y las tasas de recidiva local y supervivencia libre de enfermedad.
2. Valorar la utilidad de la Resonancia Magnética de alta resolución en la estadificación preoperatoria de los pacientes.
3. Decidir en base a los hallazgos de la Resonancia Magnética, sobre la conveniencia de emplear un tratamiento neoadyuvante normalizado

PROYECTO DE CÁNCER RECTAL ESPAÑOL

Centros Participantes y criterios de inclusión de los mismos:

La inclusión de los centros se realizó mediante la cumplimentación de una encuesta voluntaria dirigida a todos los cirujanos inscritos en la Sección de Coloproctología de la Asociación Española de Cirujanos.

Los centros participantes debían aceptar los siguientes compromisos, establecidos por la Asociación Española de Cirujanos.

1. Tener unidades de Coloproctología con los requerimientos de personas y métodos diagnósticos y terapéuticos requeridos en la encuesta.
2. La obligatoriedad de remitir los datos completos de cada registro al centro de recogida, ajustándose a los casos esperados por mes a la estimación que se haya hecho en el centro participante.
3. Los resultados de la actividad quirúrgica serían auditados de forma continuada durante un periodo de 5 años, mediante una base de datos centralizada cuya gestión sería realizada por la sección de Gestión de Calidad de la Asociación Española de Cirujanos.
4. Este proyecto implicaba la participación activa de los patólogos, radiólogos y oncólogos de los hospitales que quisieron colaborar en él, ya que tanto las imágenes radiológicas empleadas en la estadificación como las piezas quirúrgicas, fueron auditados de forma externa por comités de cada una de las disciplinas no quirúrgicas implicadas, radiología y anatomía patológica, para conocer la variabilidad entre los profesionales.
5. Además, la decisión sobre la utilización de tratamientos complementarios, neoadyuvante y adyuvante, dependería del protocolo que establecieran los oncólogos de los centros participantes. Por razones obvias, este debería ser tan homogéneo como sea posible.

6. Que el no cumplimiento de las obligaciones como centro participante, comportaba la exclusión de todo el grupo de la participación en el Congreso y Reunión de la AEC en los dos siguientes años, así como de la publicación de los resultados en la Revista Cirugía Española.

7. Los centros participantes en el estudio que no cumplieran las condiciones estipuladas en el mismo, serían advertidos por vía E-mail en primer lugar, y posteriormente por correo certificado, requiriendo la normalización inmediata de su aporte de datos, y en su defecto, serían excluidos del Proyecto.

Se formaron grupos multidisciplinares de 60 hospitales entre 2006 y 2009. Recientemente han sido presentados los resultados preliminares obtenidos hasta el año 2010 (Ortiz et al, 2013). El periodo de inclusión de pacientes para el presente estudio fue de 2006 a 2010. Nueve hospitales se excluyeron del análisis debido a problemas con el registro de datos. Por ello el estudio incluyó el estudio de 51 hospitales, incluyendo entre ellos 25 hospitales universitarios.

Los hospitales incluidos en el estudio comprenden pacientes procedentes de un área geográfica de 19.329.992 habitantes, representando el 42 % de la población de España. Entre marzo de 2006 y junio de 2010 se operaron 4.700 pacientes de cáncer de recto en estos 51 hospitales. La media de pacientes por hospital fue de 73 (con un rango de 19-329). En cada hospital las intervenciones fueron realizadas por cirujanos entrenados en los cursos de formación asistidos por el equipo quirúrgico de su unidad colorrectal.

De los 4700 pacientes operados, 3213 (68.4%) se etiquetaron como resecciones curativas. De acuerdo con el Registro Noruego, los 78 pacientes con proctocolectomía total o exanteración pélvica (1,6 %) no se incluyeron en el estudio.

Se realizó Resonancia Magnética Nuclear prequirúrgica en el 77,4 % de todos los pacientes. El tratamiento neoadyuvante se indicó en 1894 (60,6 %) de los pacientes, todos ellos con resecciones curativas.

Definiciones y consensos

Como criterio de inclusión se consideraron los tumores localizados a menos de 15 cm del margen anal medidos con rectoscopio rígido. Con el fin de analizar los resultados con reproducibilidad respecto al Proyecto de Noruega, se adoptaron las mismas definiciones respecto a la cirugía radical.

Definiciones generales:

Recto: Aunque hay diferencias entre los anatomistas y los cirujanos, desde el punto de vista quirúrgico se considera como recto el espacio de tubo digestivo comprendido entre la unión anorrectal y el promontorio sacro.

La longitud del mismo medido mediante rectoscopia rígida desde el margen anal es de 12 -15 centímetros. En este estudio, se considera la distancia de 15 centímetros como el límite superior del recto. Desgraciadamente, la medida por rectoscopia depende en gran medida del cuidado con el que se realice. Por ello, para evitar la inclusión de tumores del denominado “recto-sigma” (CIE 19-9) en la base de datos, se sugiere un cambio en la forma de determinar la situación anatómica del tumor.

Desde el punto de vista radiológico, el recto se definirá mediante resonancia magnética nuclear (RMN) como la parte del tubo digestivo situado por debajo de una línea que une el promontorio sacro con la parte superior del pubis (Fig. 7). Por tanto solo los tumores que estén por debajo de esta línea serán considerados como tumores de recto (comentario).

Por otra parte, la determinación de la altura en centímetros es necesaria, para evaluar los resultados del tratamiento y poder compararnos con otros estudios. Por ello, es conveniente seguir midiendo la distancia del tumor,

mediante rectoscopia rígida, una vez que se haya decidido mediante la Resonancia Magnética que el tumor está situado en el recto (Wolf et al, 2007; Herold et al, 2008).



Figura 7: Delimitación del recto según parámetros radiológicos (Resonancia Magnética Nuclear).

Resección paliativa: resección en un paciente que tiene metástasis a distancia diagnosticadas en estudio preoperatorio o intervención quirúrgica que conlleva la presencia de tumor residual macroscópico en la pelvis (R2).

Resección con intención curativa: aquellas resecciones rectales con intención de extirpación completa del tumor, incluyendo pacientes con afectación tumoral microscópica de los márgenes de resección, especialmente el margen de resección circunferencial, así como pacientes con perforación intraoperatoria del tumor o de la pared del recto.

En una [resección curativa](#) la pieza quirúrgica muestra un margen circunferencial libre de tumor (>1mm) y ausencia de perforación intraoperatoria del recto.

[Recurrencia local](#): enfermedad recurrente en la pelvis incluyendo la zona de la anastomosis y la herida perineal. La recurrencia aislada en los ovarios se informa como metástasis a distancia. Se considera que la recidiva existe cuando hay una prueba de imagen que la muestra (TC, RM, PET), CEA positivo o bien una biopsia positiva si es posible (Bulow et al, 2003). Todos los índices de RL se contemplan como la suma de la RL que se da de forma aislada junto con aquella concomitante con metástasis a distancia.

[Metástasis a distancia](#): bajo este concepto se incluye la enfermedad recurrente localizada fuera de la pelvis, incluyendo las metástasis en los ganglios para aórticos e inguinales.

[Resección anterior \(RA\)](#): Este término incluye una resección de recto con anastomosis, bien sea ésta coloanal o colorrectal.

[Amputación Abdomino Perineal \(AAP\)](#): Resección del recto y el ano y formación de una colostomía terminal.

[Operación de Hartmann](#): Resección del recto con cierre del extremo distal y abocamiento del colon proximal formando una colostomía terminal.

Complicaciones del tratamiento:

[Fuga o dehiscencia anastomótica](#): peritonitis o absceso causado por la fuga desde la línea de grapas confirmada radiológicamente o clínicamente por el cirujano.

[Mortalidad quirúrgica](#): cualquier muerte producida dentro de los 30 primeros días de postoperatorio.

[Infección de herida](#): Se empleará la definición de la misma empleada por el Centers for Disease Control and Prevention. De acuerdo con ella, se

contemplan tres tipos de infecciones: superficial, profunda y de órgano/espacio (Horan et al, 1992).

Anatomía patológica:

Clasificación anatomopatológica de los tumores: La clasificación para la estadificación patológica de las piezas quirúrgicas era la clasificación TNM de la American Joint Committee on Cancer. A pesar de los cambios introducidos recientemente en la versión TNM7 la utilizada en el estudio será la TNM6 (Stages I-IV; 6th edition).

En la descripción se añade el prefijo “y” en aquellos pacientes en los que la clasificación se realiza cuando se ha administrado un tratamiento neoadyuvante (radioterapia, quimioterapia o radioquimioterapia) (ypTNM). Y el prefijo “r”, que indica un tumor recidivado después de un periodo conocido libre de enfermedad (prTNM). Estos prefijos no alteran la clasificación siguiente, pero sirven para indicar que casos pueden necesitar un análisis separado.

Calidad de resección del mesorrecto: Se valora según la escala propuesta por Quirke y Nagtegaal en estudios previos (Nagtegaal et al, 2002; Quirke et al, 2009)

Resumen de la clasificación:

1. Plano de la muscular propia (previamente denominado mesorrecto pobre o incompleto): Este plano tiene poca cantidad de mesorrecto con defectos en el mismo de más de 1 cm² o que llegan hasta la muscular propia, con un margen de resección circunferencial irregular (Fig. 8).



Figura 8: Resección incompleta de mesorrecto. La resección está en el plano de la muscular propia.

2. **Plano intra-mesorrectal** (previamente: parcialmente completo). Este plano tiene una cantidad moderada de mesorrecto, pero con una superficie irregular y un efecto de cono moderado. Hay incisiones profundas o pérdida parcial de grasa. En ningún sitio se ve la muscular propia (Fig. 9).

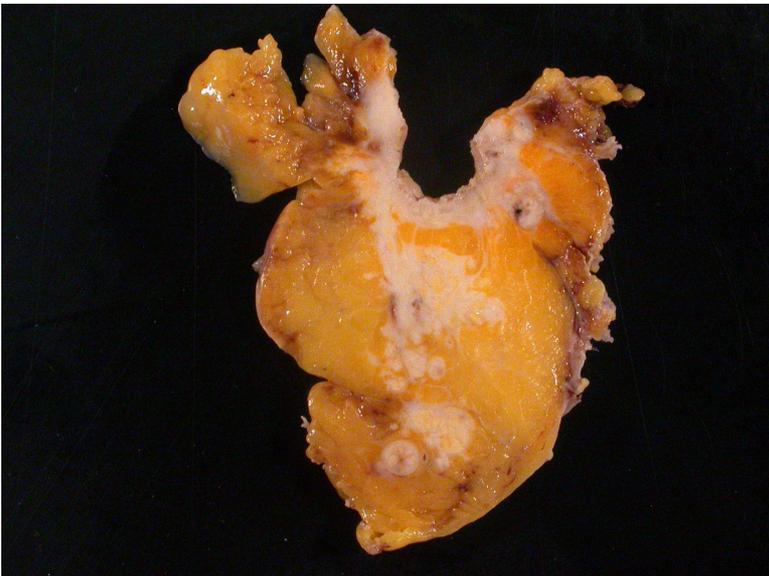


Figura 9: Resección incompleta de mesorrecto. La resección está en el plano intra-mesorrectal.

3. Plano del mesorrecto: (previamente mesorrecto bueno o completo): Este plano tiene un mesorrecto completo, aunque haya pequeñas irregularidades de la superficie lisa del mismo. Si hay defectos, tienen una profundidad máxima de 5 mm. No son más profundos. No hay efecto de cono en el margen distal. El margen circular es liso, de bordes suaves y superficie brillante en los cortes del mesorrecto (Figs. 10 y 11).



Figuras 10 y 11: Resección completa del mesorrecto. La resección se encuentra en el plano del mesorrecto. Vista de la cara posterior del recto (Fig. 10) y corte transversal del mismo (Fig. 11).

Calidad de resección del conducto anal:

En las piezas de amputación abdomino-perineal se revisará también la calidad de la cirugía del conducto anal mediante una segunda escala, valorando el tramo inferior del mesorrecto. En estos casos la cirugía óptima resulta más complicada, ya que la ausencia de grasa peritubular dificulta unos márgenes de resección amplios (Nagtegaal et al, 2005). La clasificación sería la siguiente:

Plano intramuscular/ submucoso (resección incompleta): En este plano hay perforaciones del intestino, pérdidas de sustancia en la muscular propia que indican la entrada en el tubo muscular a este nivel.

Plano esfinteriano (resección moderada o parcialmente completa): Este plano tiene el margen de resección circular en la musculatura esfinteriana, que esta intacta. No hay músculos elevadores unidos a la muestra.

Plano por fuera de los elevadores (resección completa): En éste se observa un espécimen cilíndrico (componente circunferencial completo) con los elevadores resecados en bloque (Fig. 12).

Por tanto, para los casos de resección anterior habrá una única clasificación (mesorrecto) y para los de amputación abdomino-perineal dos clasificaciones (mesorrecto y canal anal).

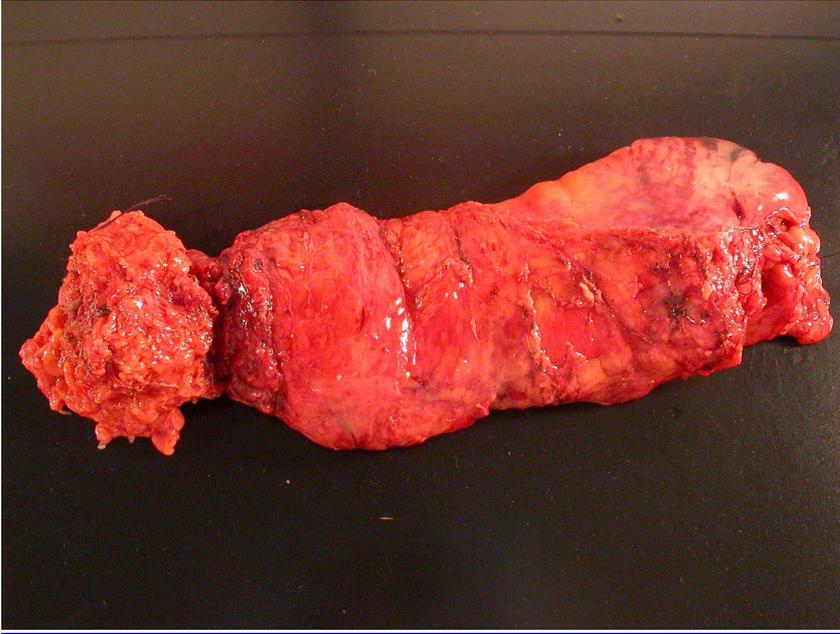


Figura 12: Resección completa del canal anal y del mesorrecto. La resección se encuentra en el plano del mesorrecto y por fuera de los elevadores.

Margen de resección circular (MRC) o margen radial: Se considera como tal la superficie externa del cilindro de recto y mesorrecto resecados. La distancia del tumor o de los ganglios linfáticos invadidos al MRC medido por microscopía, permite clasificarlo como invadido o no. En este estudio, se ha definido que el MRC esta invadido cuando esta distancia es: \leq de 1mm (Fig. 13 y 14).



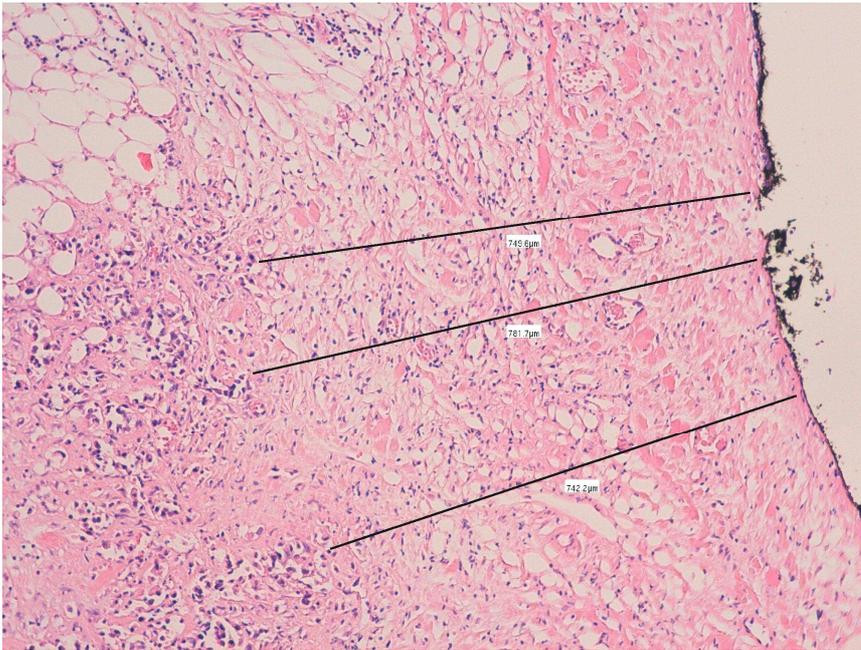


Figura 13 y 14: Estudio del MRC: 13: estudio macroscópico. 14: Estudio microscópico: se mide la distancia entre las células o glándulas tumorales más profundas y el margen quirúrgico (marcado con tinta china).

Estadio R (Clasificación de las operaciones por el tumor residual):

R0 (no hay tumor macroscópico ni microscópico residual).

R1 (tumor microscópico residual en el MRC).

R2 (tumor macroscópico en el MRC).

Sólo son operaciones curativas las clasificadas como R0.

Grado de Regresión tumoral

En los casos en los que se haya realizado tratamiento neoadyuvante (fig. 15 y 16) se valora histológicamente el Grado de Regresión (GR). Utilizaremos la clasificación de Mandard (Mandard et al, 1994). En ella se valora la proporción entre la cantidad de tumor residual y la cantidad de fibrosis presente, de acuerdo a la siguiente clasificación (Fig. 17, 18 y 19):

GR1: Ausencia de carcinoma (remisión completa).

GR2: Algunas células neoplásicas/glándulas residuales aisladas.

GR3: Predominio de fibrosis sobre tumor.

GR4: Regresión parcial con predominio de tumor sobre fibrosis

GR5: Tumor sin cambios.

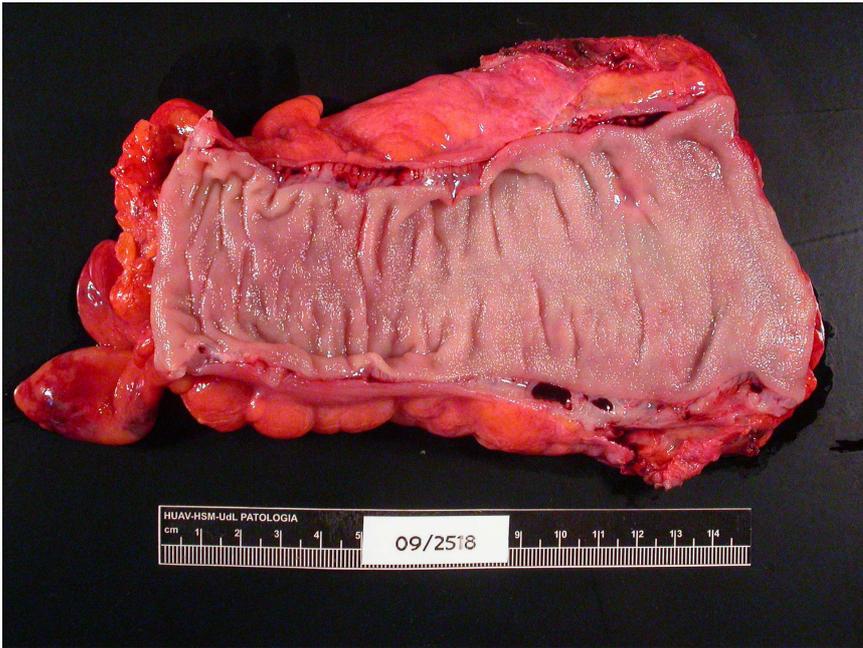


Figura 15: Imagen macroscópica de una pieza de resección tras tratamiento neoadyuvante. Zona de úlcera correspondiente al lecho tumoral.



Figura 16: Imagen macroscópica de una pieza de resección tras tratamiento neoadyuvante. Aproximación de la zona de la úlcera.

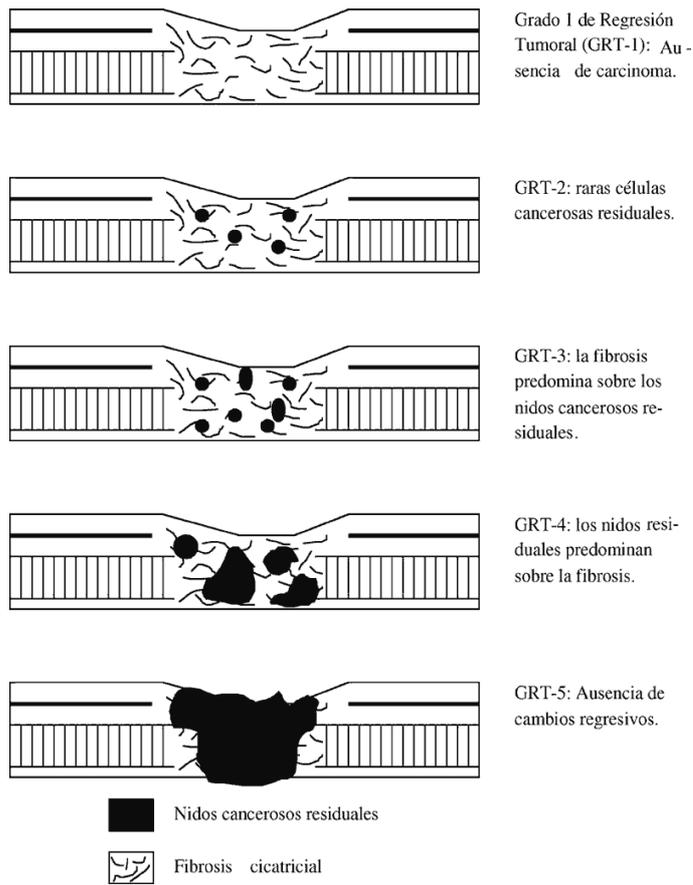


Figura 17: Esquema de los diferentes grados de regresión tumoral según la clasificación de Mandard (Mandard et al, 1994)..



Figura 18: Imagen macroscópica de los cortes transversales de la zona de la úlcera en una pieza de resección de recto tratada con neoadyuvancia.

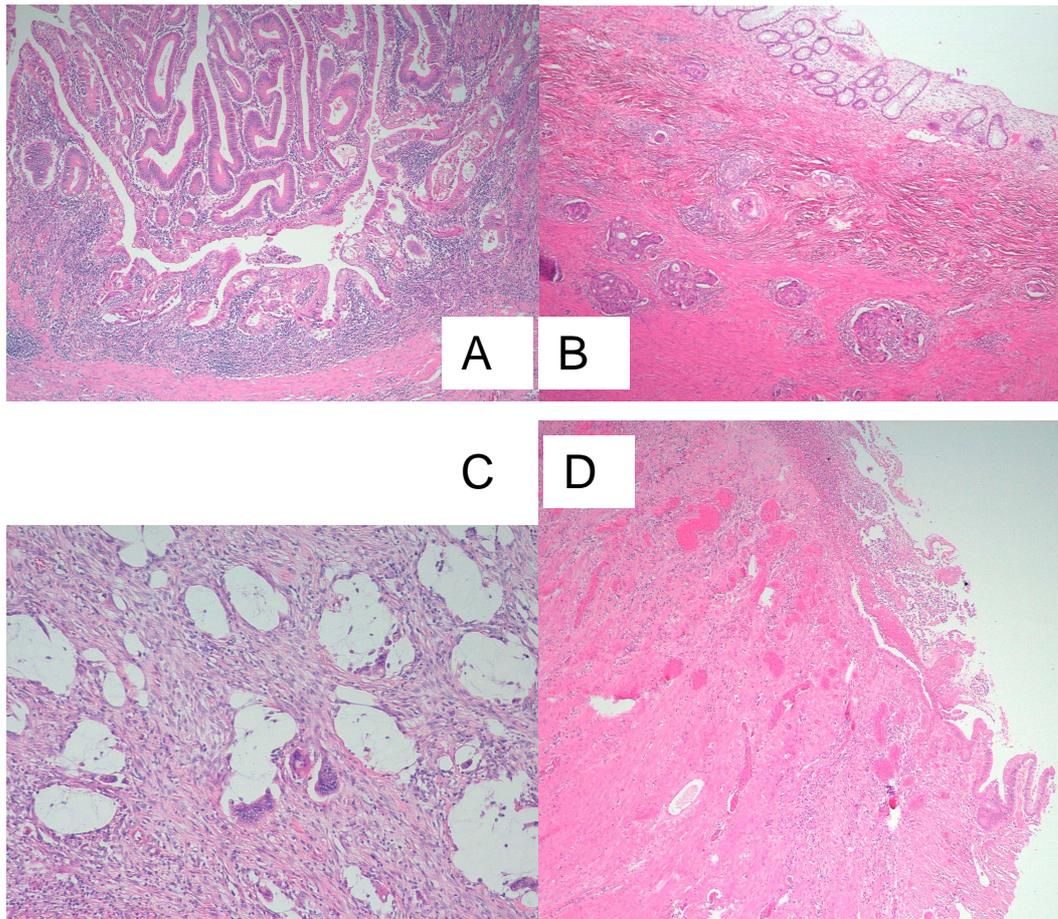


Figura 19: Grados de regresión tumoral. A: Regresión parcial con predominio de tumor sobre fibrosis. B: Predominio de fibrosis sobre tumor. C: glándulas residuales aisladas. D: Ausencia de carcinoma

Registro de datos

Se diseñó una base de datos específica de cáncer de recto. El registro incluyó a todos los pacientes operados de cáncer de recto en los centros participantes. Fueron registradas todas las intervenciones: operaciones sin resección (estomas, bypass o laparotomías exploradoras), escisiones locales y resecciones de recto, incluyendo proctocolectomías totales o subtotales, resecciones anteriores, exanteraciones pélvicas y la intervención de Hartmann. Cada hospital participante designó un cirujano responsable para el registro y posterior informe de los datos. Dichos cirujanos enviaban la

información al registro con periodicidad trimestral para los nuevos casos y anual para el seguimiento.

En los datos registrados se incluyen las características del paciente, el tipo de cirugía, la morbilidad y mortalidad postquirúrgica, detalles del tratamiento adyuvante e información de seguimiento en cuanto a recurrencia local, metástasis y muerte. El Registro Nacional de Mortalidad en España proporcionó información puntual sobre los fallecimientos, con lo que los datos de supervivencia se dieron como supervivencia global.

Seguimiento

Los pacientes fueron sometidos a un protocolo de seguimiento cada 3 meses durante los primeros 2 años y cada 6 meses a partir de entonces hasta alcanzar 5 años posteriores a la cirugía. Dicho protocolo incluye perfil hemático y bioquímico general, antígeno carcinoembrionario (CEA), tomografía axial computerizada (TAC) abdominal y torácica. Se realizan colonoscopías de forma anual. Si se sospecha RL se confirmará dicho diagnóstico mediante RMN pélvica y tomografía de emisión de positrones (TAC-PET). La planificación del seguimiento individualizado se dejó a criterio de cada hospital participante.

De esta manera se completó el formulario de registro de seguimiento que incluía datos de RL, presencia de metástasis, segundos tumores y supervivencia/mortalidad.

La información del seguimiento fue incorporada anualmente a la base de datos central. De forma anual cada hospital recibió un informe de sus resultados comparándolos con las medias globales obtenidas en el proyecto de Cáncer de Recto.

Tratamiento neoadyuvante

La decisión de si realizar radioterapia se hace en base a las recomendaciones de las Guías de Práctica Clínica en Cáncer de España (<http://www.gencat.cat/salut/depsan/pdf/og0303es.pdf>) La quimioterapia y radioterapia neoadyuvantes se consideraron el tratamiento de elección para el cáncer de recto en estadios II y III. Las contraindicaciones para dicho tratamiento neoadyuvante fueron la edad avanzada, enfermedad cardiovascular isquémica sintomática o si el paciente ya había recibido radioterapia pélvica previamente.

Análisis estadístico

Las variables continuas se presentaron como media (desviación standard) o mediana del rango intercuartil . Las variables categóricas se presentaron como números absolutos y porcentajes. Las variables categóricas se compararon usando el test X^2 de independencia. El test t de Student o el test Kruskal-Wallis se usaron para analizar variables continuas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

1.- El estudio molecular de los ganglios linfáticos en cáncer colorrectal mediante la detección del mRNA de la Citoqueratina-19 permitiría una estadificación más precisa de dichos tumores con el consecuente valor pronóstico en cuanto a progresión de la enfermedad.

2.- La detección “ex vivo” del ganglio centinela en los tumores de colon es un método reproducible y fiable en el que se puede aplicar la detección molecular del mRNA de la Citoqueratina-19 con el fin de detectar posibles metástasis en dichos ganglios.

3.- El estudio del estado mutacional del gen K-Ras en cáncer de colon metastático, así como de sus posibles mutaciones, pueden tener un valor pronóstico en cuanto a la supervivencia y predictivo de respuesta a la terapia adyuvante en dichos pacientes.

4.- El estudio patológico de la calidad de resección del mesorrecto en las piezas quirúrgicas de cáncer de recto, que incluye la valoración de la afectación del margen circunferencial y el grado de respuesta en los tumores tratados con neoadyuvancia, son factores pronósticos en cuanto a posibles recidivas, progresión de la enfermedad y supervivencia.

OBJETIVOS

1.- El estudio molecular de los ganglios linfáticos en piezas de resección quirúrgica “ex vivo” de cáncer colorrectal mediante la detección del mRNA de la Citoqueratina-19 a través de método OSNA en una serie de 100 pacientes con estudio radiológico previo negativo para ganglios linfáticos metastáticos con el fin de detectar posibles ganglios positivos para OSNA que, sin embargo, eran negativos en el estudio convencional con Hematoxilina-Eosina.

2.- Establecer un protocolo de mapeo “ex vivo” de ganglios linfáticos en piezas de resección quirúrgica de una serie de 20 pacientes de cáncer de recto con el fin de identificar ganglios centinela en relación al tumor primario.

3.- Realizar el estudio molecular de los ganglios centinela aislados mediante la detección del mRNA de la Citoqueratina-19 a través de método OSNA con el fin de valorar la sensibilidad de la técnica de mapeo establecida anteriormente.

4.- Identificar el estado mutacional del gen k-Ras en sus codones 12 y 13 en una serie de 200 pacientes diagnosticados de cáncer colo-rectal con metástasis en el momento del diagnóstico o bien durante el seguimiento. En

los casos con el gen K-Ras mutado determinar el tipo de mutación y el codón donde está localizada.

5.- Relacionar los datos obtenidos sobre mutación del gen K-Ras con variables clinicopatológicas de los pacientes: edad, sexo, supervivencia, tipo histológico y grado histológico de los tumores.

6.- En una serie de 200 pacientes de cáncer de recto intervenidos en nuestro centro recoger parámetros pronósticos obtenidos a partir de la valoración de las piezas quirúrgicas, como el estadio patológico, la calidad de resección del mesorecto, la distancia al margen de resección radial y, en caso de tumores tratados con neoadyuvancia, el grado de regresión post-tratamiento.

7.- Relacionar los datos histopatológicos obtenidos en la serie con datos de seguimiento relativos a posibles recurrencias, presencia de metástasis y supervivencia, así como la presencia de complicaciones postquirúrgicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- OSNA Y GANGLIO CENTINELA

PACIENTES

El estudio se lleva a cabo después de ser aprobado por los diferentes Comités Éticos de Investigación Clínica de cada centro que ha participado en el estudio: Lleida (Hospital Universitari Arnau de Vilanova), Erlangen (Friedrich-Alexander-Universität), Munich (Technische Universität) y Basilea (Kantonsspital Olten y Viollier AG) . Se reclutaron un total de 103 pacientes entre 2010 y 2012 con diagnóstico histológico previo por biopsia endoscópica de adenocarcinoma de colon. Todos ellos mayores de 18 años y con consentimiento informado previo. Las diferentes características de los pacientes están resumidas en la Tabla 1. Se excluyeron para este estudio aquellos pacientes con tumores sincrónicos, metástasis a distancia (M1) o que hubiesen recibido tratamiento neoadyuvante (previo a la cirugía). Se clasificaron como tumores de colon aquéllos situados a una distancia mínima al margen anal de 16 cm, medido con colonoscopio rígido. La resección quirúrgica se realizó tanto por escisión mesocólica completa abierta como mediante técnicas laparoscópicas con linfadenectomía regional estandarizada (Lee et al, 2012; West et al, 2010). Inmediatamente después de la cirugía, la pieza quirúrgica se remite a Servicio de Anatomía Patológica para la disección en fresco de los ganglios linfáticos del mesocolon, para seguir con el protocolo de estudio estandarizado con OSNA.

Características	Pacientes		OSNA negativo		OSNA positivo		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Total	103	(100)	77	(74.8)	26	(25.2)	
Sexo							
Femenino	49	(47.6)	35	(71.4)	14	(28.6)	0.50
Masculino	54	(52.4)	42	(77.8)	12	(22.2)	
Edad							
Media (rango)	71	(23-92)	71	(23-90)	71	(50-92)	0.8
Cirugía							
Abierta	81	(78.6)	58	(71.6)	23	(28.4)	0.27
Laparoscopia	22	(21.4)	19	(86.4)	3	(13.6)	
Longitud de colon resecado (cm)							
Media (rango)	29.5	(8-73)	27	(8-73)	33.5	(15-65)	0.27
Localización del tumor							
Ciego	20	(19.4)	12	(60)	8	(40)	0.34
Colon ascendente	34	(33)	27	(79.4)	7	(20.6)	
Ángulo hepático	2	(1.9)	2	(100)	0	(0)	
Colon transverso	7	(6.8)	5	(71.4)	2	(28.6)	
Ángulo esplénico	1	(1)	1	(100)	0	(0)	
Colon descendente	9	(8.7)	5	(55.6)	4	(44.4)	
Colon sigmoide	30	(29.1)	25	(83.3)	5	(16.7)	

Tabla 1: Características demográficas de los pacientes en el estudio de la supraestadificación de cáncer de colon con ganglios linfáticos histopatológicamente negativos.

Para el estudio de ganglio centinela se incluyeron también pacientes mayores de edad diagnosticados de cáncer de colon primario y en cuyas piezas quirúrgicas “ex vivo” se practicaría el mapeo para la detección de

ganglio centinela. Se excluyeron pacientes con metástasis y/o tratados con neoadyuvancia.

Se estudiaron un total de 22 casos, identificando en cada caso el número de GC aislados, el número de GNC y el número de ganglios aislados posteriormente en la pieza fijada para estudio convencional. En cada uno de los ganglios identificados como GC y GNC se realiza el estudio molecular con la técnica OSNA.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio se diseñó para confirmar la potencial supraestadificación con OSNA de pacientes con carcinoma de colon, con lo que éstos podrían pasar de Estadío I/II a Estadío III de la UICC. El Estadío I o II se confirma con estudio histológico estudiando un corte de cada ganglio linfático, que reservamos para procesamiento estandarizado en parafina y tinción con H/E (Figura 20). En este estudio la decisión de administrar tratamiento adyuvante se basó exclusivamente en los resultados histológicos, en ningún caso en los resultados moleculares.

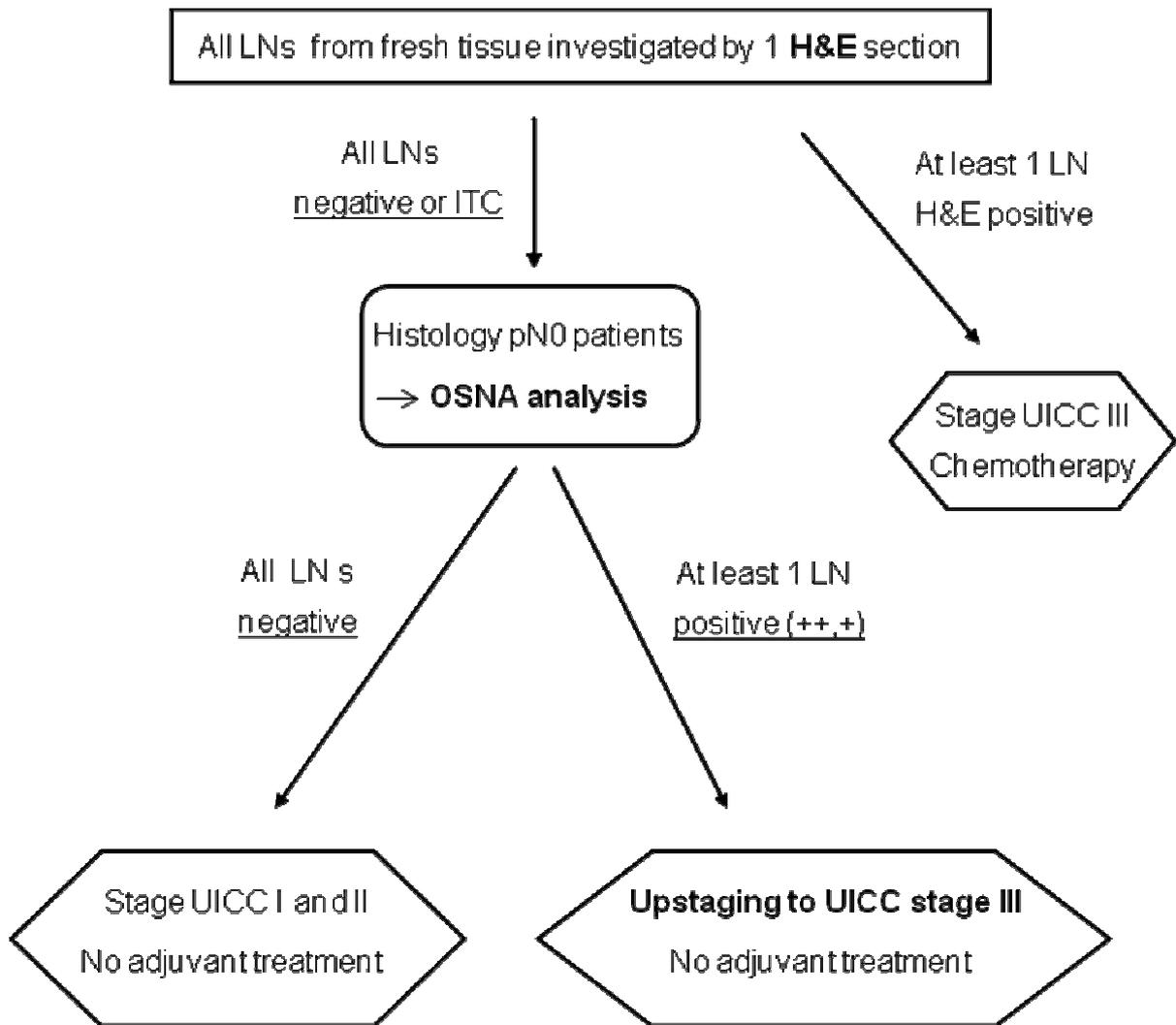


Figura 20: Diseño del estudio de la supraestadificación de cáncer de colon con ganglios linfáticos histopatológicamente negativos hacia tumores con ganglios linfáticos positivos mediante tecnología One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) (++) número de copias de CK19 mRNA ≥ 5000 , (+) entre 250-4999; LN: Ganglio Linfático; ITC: Células Tumorales Aisladas; H&E: hematoxilina & eosina

PROCESAMIENTO DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS

Los ganglios linfáticos fueron disecados en las piezas quirúrgicas inmediatamente después de la cirugía. Tras la disección de cada ganglio linfático seguidamente se realiza un corte de 1 mm de grosor que se recoge en cápsulas de inclusión y se fija en formaldehído. El resto de ganglio linfático se reserva para estudio molecular. Éste material se introduce en un

tubo estéril en nitrógeno líquido o hielo. Inicialmente los cortes de 1mm de todos los ganglios linfáticos se analizaron por métodos histológicos estandar (1 sección teñida con H/E por cada ganglio), mientras que el resto de material en fresco se almacenó a una temperatura de -80°C hasta el momento de la realización del estudio con OSNA (Figura 21).

Los ganglios linfáticos con un tamaño inferior a 3 mm se excluyeron del análisis con OSNA, ya que contenían muy escaso tejido ganglionar, aunque igualmente se estudiaron desde el punto de vista histopatológico.

Una vez confirmados en todos los ganglios linfáticos que histológicamente no presentaban metástasis (pN0), se procedía al estudio molecular del tejido almacenado en congelación. Dicho estudio se realizó en los centros de Lleida, Basilea, Erlangen y Lübeck. En cambio, solamente con la confirmación de 1 ganglio linfático positivo (macro o micrometástasis) en el estudio histológico con H/E, este paciente quedaba descartado para el estudio con OSNA.

Una vez realizado el estudio molecular, si al menos uno de los ganglios linfáticos era positivo para OSNA en un paciente pN0 con el estudio histológico, **este paciente pasaba a supraestadificarse**, mientras que si todos los ganglios eran OSNA negativos el paciente mantenía la estadificación previa (Figura 20).

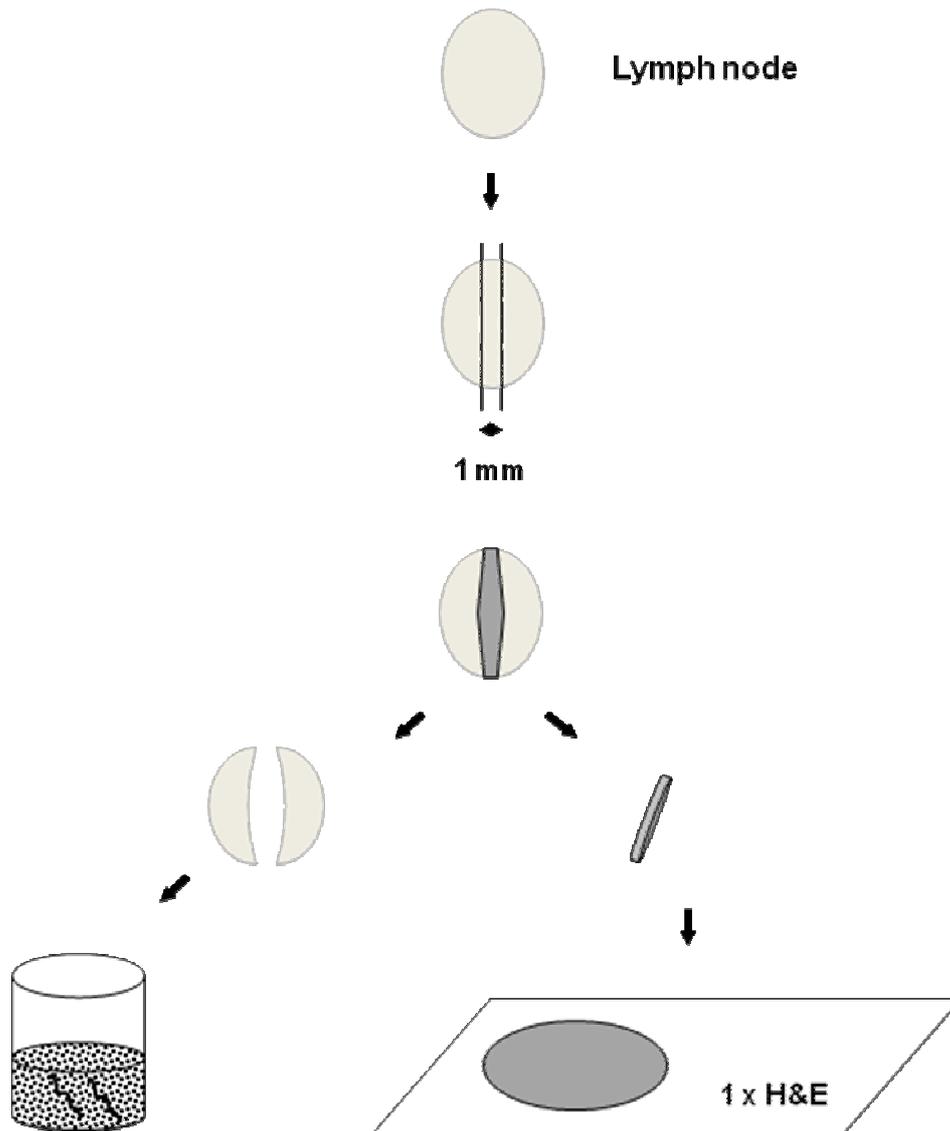


Figura 21: Preparación del ganglio linfático para estudio histológico y estudio mediante OSNA. La parte media o central del ganglio linfático se analiza mediante estudio histopatológico convencional (se tiñe una sección con hematoxilina & eosina [H&E]) en aquellos ganglios linfáticos de >6mm de diámetro máximo. En los ganglios linfáticos que miden entre 4mm - 6mm se divide en dos secciones reservándose una de ellas para análisis mediante OSNA . Si el tamaño del ganglio es ≤ 3 mm éste se excluye del estudio OSNA. En los casos en los que la tinción H&E sea negativa para tumor se procederá a analizarse las partes laterales o la hemisección reservadas de los ganglios linfáticos mediante OSNA.

En cuanto al protocolo de mapeo de ganglio centinela “ex vivo”, éste se realizó 15 minutos después de la extirpación de la pieza quirúrgica. Una vez localizada la zona donde está situado el tumor, se inyectan de 0.5 a 2 ml del colorante Patent Blue V en la subserosa circunferencial al tumor

utilizando una jeringa de inyección de tuberculina. Seguidamente se realizó un masaje de la zona durante 5 minutos con el fin de favorecer la difusión del colorante a través de los vasos linfáticos. El colorante teñirá de color azul en primer lugar los ganglios linfáticos centinela (Figura 22). Éstos se identifican y se extraen procediendo igualmente al protocolo de estudio OSNA descrito anteriormente. En todo el procedimiento posterior, tanto en el tejido congelado para OSNA, como en el fijado en formol para estudio convencional, cada muestra estará identificada como GC o GNC.

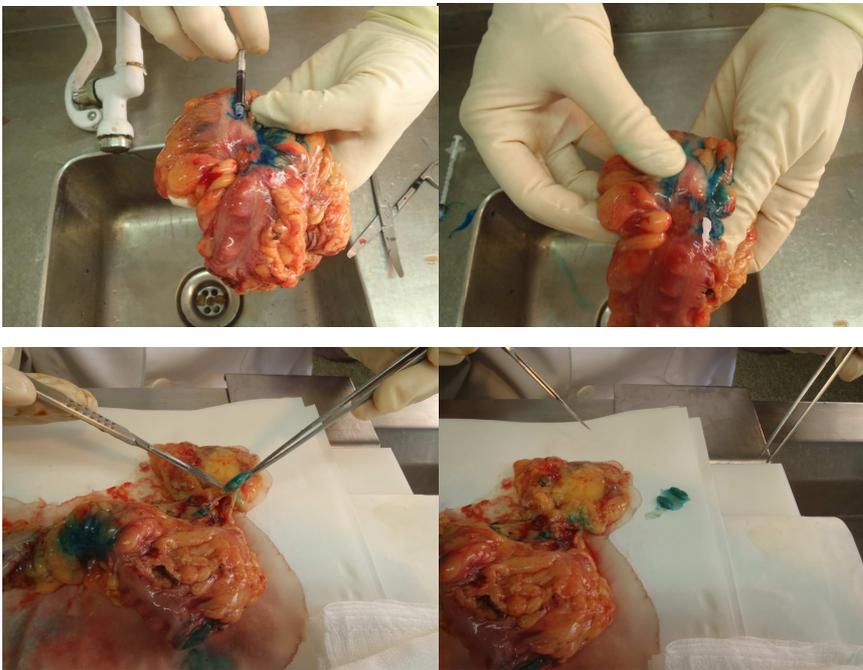


Figura 22: Mapeo para la identificación "ex vivo" de GC utilizando inyección de colorante Patent Blue V.

HISTOPATOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA CON CK19

En todos los tumores primarios se realizó estudio inmunohistoquímico con anticuerpos anti-receptor de Citoqueratina-19 (CK19) utilizándose un anticuerpo monoclonal primario de ratón (Baloch et al, 1999; Uen et al, 2007). Para ello se cortaron secciones de 3µm de los bloques incluidos en

parafina, secándose durante 1 hora a 65°. Luego se procedió a desparafinación, rehidratación y recuperación del antígeno mediante tratamiento con calor en un PT Link (Dako, Denmark) a pH 9. Antes de la tinción de los cortes se bloqueó la peroxidasa endógena. El proceso inmunohistoquímico se llevó a cabo usando el sistema de visualización Envision FLEX (Dako, Denmark) con un anticuerpo contra CK19 (clon RCK108, Dako, Denmark). Dichas secciones fueron posteriormente sometidas a contratinción automatizada con hematoxilina y tratada con un reactivo *bluing*. La valoración de cada tinción inmunohistoquímica se realizó a través de un microscopio óptico a 10-40 aumentos. Una expresión positiva de membrana con o sin tinción citoplasmática en el 10 % o más de las células neoplásicas fue clasificada como “positiva” (+) para CK19. Cada caso de carcinoma de colon fue teñido y evaluado para CK19, así como algunos ganglios linfáticos positivos en el estudio histológico (Figura 23).

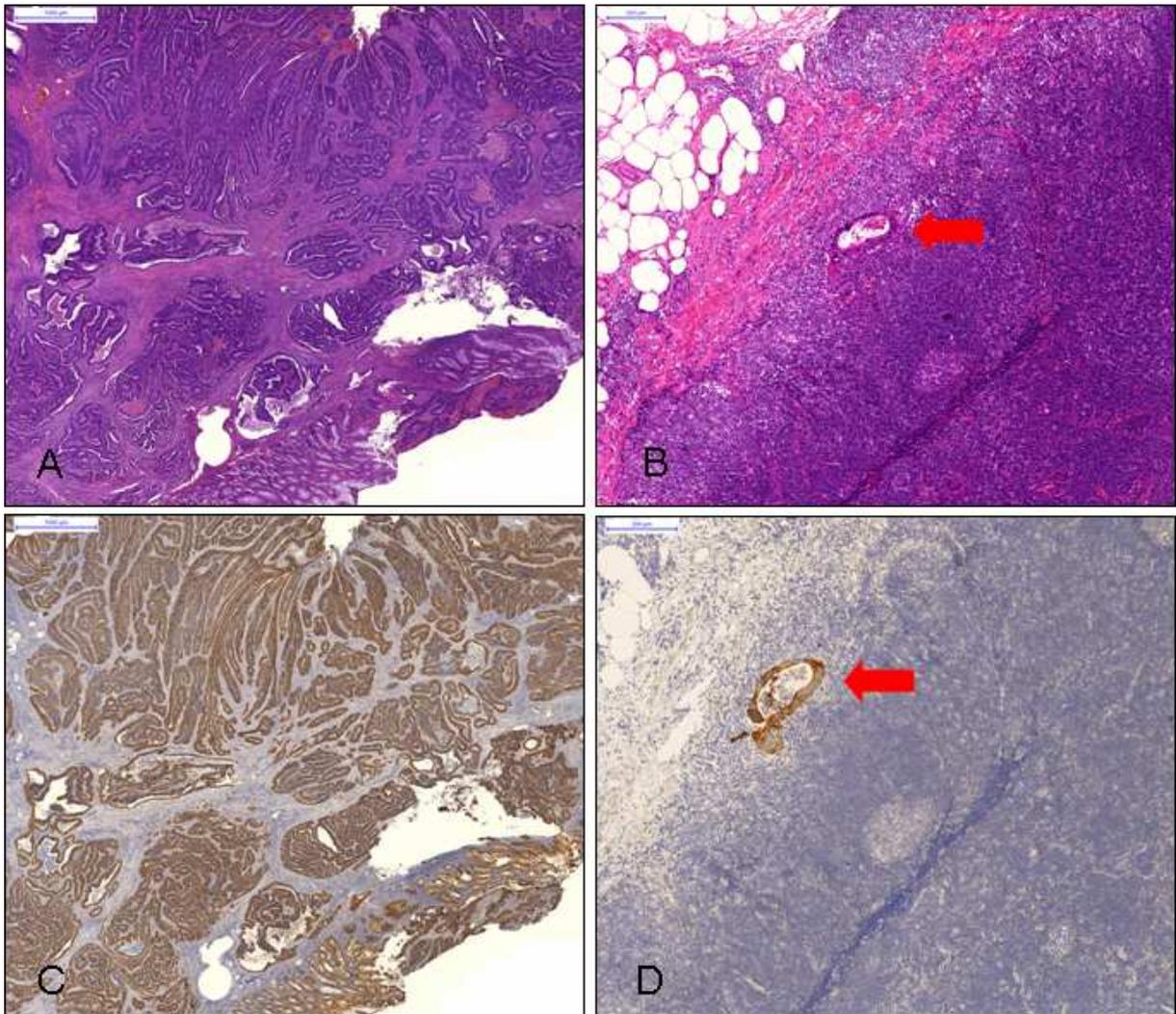


Figura 23: Tinciones con Hematoxilina & Eosina (H&E) (A, B) y con inmunohistoquímica para CK19 (C, D) de un tumor primario (A, C) y un ganglio linfático con metástasis (flechas rojas: B, D) en un carcinoma de colon.

ONE-STEP NUCLEIC ACID AMPLIFICATION (OSNA)

El tejido de cada ganglio linfático reservado para OSNA (con un peso máximo de 600 mg por muestra) fue congelado y almacenado a -80° hasta su utilización. El análisis por OSNA en todos los casos se realizó dentro de los 6 meses después de la recogida de la muestra. En los casos en los que el tejido ganglionar reservado para OSNA excediera los 600 mg, éste se

dividió en varios fragmentos, todos ellos con un peso inferior a 600 mg, y de este modo cada porción se analizó como una muestra independiente.

Se realizó una detección rápida de RNA mediante la obtención de porciones homogeneizadas del tejido ganglionar disecado y la amplificación directa de mRNA de CK19 sin extracción previa ni purificación de ácidos nucleicos (DNA y/o RNA). En éste método se utilizó un sistema de reactivos diseñado, según las instrucciones de uso del fabricante (Sysmex, Kobe, Japón). Basado en estudios previos, los resultados del estudio OSNA se clasificaron como (++) cuando el número de copias de mRNA de CK19 fue superior a 5000 y (+) cuando dicho número se encontraba entre 250-4999. Números inferiores a 250 copias fueron considerados como negativos. Este número de copias se ha definido en estudios previos con el fin de asegurarse de que sólo las macrometástasis (>0,2 mm) fueran consideradas enfermedad metastásica, excluyéndose así tanto las micrometástasis (<0,2 mm) como la presencia de células tumorales aisladas (Croner et al, 2010; Guller et al, 2012; Tsujimoto et al, 2007).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los estudios estadísticos se han calculado mediante software SAS 9.2. (SAS Institute Inc, 2010b). El Cochran-Armitage trend test es el adecuado para una tabla de dos variables donde una de ellas tiene dos niveles y la otra es ordinal (P, 1955). Este test se emplea con datos categóricos para establecer la asociación entre una variable con 2 categorías y otro variable con k categorías. Modifica el test Chi Cuadrado para incorporar un supuesto orden en los efectos de las k categorías sobre la segunda variable. La variable de dos niveles representa la respuesta mientras que la segunda variable representa una variable explicativa con niveles ordenados. El

Cochran-Armitage trend test se basa en el coeficiente de regresión para la regresión lineal ponderada de las proporciones binomiales para los valores de los niveles de la variable explicativa. La opción exacta se usó para calcular los valores P (SAS Institute Inc, 2010a). Para calcular los valores P en todas las tablas de frecuencia se utilizó el test exacto de Fischer. Las medias aritméticas de las variables métricas se compararon por test $-t$ usando la varianza combinada para calcular el rango de error. En todos los casos se informaron de valores P bilaterales. Después del ajuste a múltiples test según el procedimiento de Holm-Bonferroni, el valor crítico para la significancia que garantiza un alfa global de 0,005 llega a ser de 0,003.

2.- ESTUDIO DEL GEN K-Ras

SELECCIÓN DE CASOS

Se estudia el estado mutacional de K-Ras en 205 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma colorrectal entre los años 2006 y 2013. Se trata de pacientes con tumores en estadio IV (con metástasis durante el estudio de extensión en el diagnóstico o durante el seguimiento posterior), que podrían beneficiarse, en caso de que tuviesen el K-Ras nativo, de tratamiento de las metástasis con anticuerpos anti-EGFR.

En dichos pacientes se recogen datos patológicos y clínicos. Entre los datos patológicos se encuentran la localización del tumor, tamaño, tipo histológico, grado histológico, estadificación pTN y presencia o ausencia de factores de riesgo como permeación vascular, linfática y/o perineural, así como la presencia o ausencia del gen k-Ras mutado. Entre los datos clínicos (oncológicos) se recogieron las fechas de diagnóstico de la neoplasia y de las metástasis, así como las localizaciones de las mismas, el

tratamiento del tumor, el tratamiento de las metástasis, las diferentes líneas de quimioterapia y datos relativos al seguimiento: exitus y presencia de recidivas.

ANÁLISIS DE K-RAS

El análisis del estado mutacional del gen K-Ras se realizó en material tumoral incluido en parafina.

Extracción de ADN

Los bloques tumorales fijados en formaldehído e incluidos en parafina fueron revisados en un primer momento por el patólogo para valorar el contenido del tumor y la calidad del material genético, esogiéndose los más adecuados para el estudio.

Posteriormente se analizaron aquellas muestras con cantidad tumoral representativa (conteniendo por lo menos un 70% de células neoplásicas) El ADN genómico fue extraído utilizando el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) según lo especificado por las instrucciones del fabricante.

Análisis del estado mutacional de K-RAS

El estado mutacional de K-Ras se analizó en el Área de Patología Molecular del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida.

Sobre las muestras seleccionadas se evaluaron el codón 12 y 13 de K-RAS. El análisis mutacional se realizó mediante amplificación por PCR del exón 2 del gen K-RAS siguiendo instrucciones del kit TheraScreen KRAS por PCR QIAGEN (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha realizado un análisis descriptivo de todas las variables estudiadas. Las variables cuantitativas se han resumido en forma de media y desviación estándar o de mediana e intervalo intercuartílico, dependiendo de la simetría de su distribución. Las variables categóricas se presentan en frecuencias absolutas y relativas.

Se han evaluado las asociaciones entre las variables explicativas o posibles factores de riesgo y los tiempos desde el diagnóstico hasta la recidiva, la metástasis, y *exitus*. Se han estimado curvas de Kaplan-Meier que se han comparado mediante la prueba de *logrank* (Collet, 1994). Se han obtenido los cocientes de riesgo (hazard-ratio) y sus intervalos de confianza (95%).

Finalmente se ha estimado un modelo de supervivencia de Cox (Collet, 1994) para evaluar las variables estudiadas en el tiempo de supervivencia. Se ha contrastado la hipótesis de riesgos proporcionales mediante la prueba de correlación de los residuos de Schoenfeld (Collet, 1994).

3.- FACTORES PRONÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS

SELECCIÓN DE CASOS

Desde el año 2009 hasta el año 2013 el Hospital Universitari Arnau de Vilanova reclutó un total de 249 casos nuevos de cáncer de recto. De estos 43 no eran quirúrgicos, con lo que fueron intervenidos 206 pacientes. De estos 206, 8 de ellos se intervinieron con cirugía local, 17 fueron irresecables y el resto (181) fueron sometidos a cirugía con intención

curativa (Tabla 2) Como en el resto de hospitales, las intervenciones fueron realizadas por cirujanos entrenados en los cursos de formación asistidos por el equipo quirúrgico de su unidad colorrectal.

Casos nuevos 249		
Operados 206		No operados 52
Resecados 181	Irresecales 17	Cirugía local 8

Tabla 2: Esquema del número de pacientes que han intervenido en el estudio de cáncer de recto en nuestro hospital.

La siguiente tabla (Tabla 3) resume las características de los pacientes operados:

EDAD	68.8 (11.6) MEDIA (DESVIACIÓN ESTANDAR)
SEXO	
HOMBRE	143 (68.4%)
MUJER	66 (31.6%)
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	
0-6 cm	92 (44.0%)
7-11 cm	86 (41.1%)
12-15 cm	31 (14.8%)
ESTADÍO RADIOLÓGICO	
ESTADIO 0	2 (0.96%)
ESTADIO I	36 (17.2%)
ESTADIO II	36 (17.2%)
ESTADIO III	103 (49.3%)
ESTADIO IV	30 (14.4%)

Tabla 3: Características generales de los pacientes estudiados.

Se diseñó un circuito de recogida de datos para todos los pacientes, que incluye estudio radiológico previo, estudio de tratamiento oncológico,

protocolo quirúrgico, estudio patológico de la pieza quirúrgica y seguimiento.

ESTUDIO RADIOLÓGICO

Incluye el estadiaje preoperatorio con RMN i/o ecografía transrectal, el estudio de extensión mediante TAC, la medida de la distancia al margen radial (con RMN), así como la afectación de dicho margen, según la siguiente tabla (Tabla 4):

<p>- ESTADIAJE PREOPERATORIO</p> <p>RM si / Eco si RM no / Eco si RM si / Eco no RM no / Eco no</p> <p>- ESTUDIO DE EXTENSIÓN</p> <p>TAC</p> <p>- MEDICIÓN DE DISTANCIA MARGEN RADIAL (RNM)</p> <p>DEL TUMOR ADENOPATÍA INTEGRIDAD DEL APARATO ESFINTERANEO</p> <p><i>LIBRE</i> <i>AFECTO</i> <i>NO DATOS</i></p> <p>- MARGEN RADIAL AFECTADO</p> <p>DEL TUMOR ADENOPATÍA</p>

Tabla 4: Esquema de los diferentes parámetros recogidos en el estudio radiológico preoperatorio.

TRATAMIENTO ONCOLÓGICO

Se recogieron los datos referentes al posible tratamiento neoadyuvante (con quimioterapia y/o radioterapia) o adyuvante, y en ambos casos indicando el estadio tumoral en el momento del diagnóstico, según la siguiente tabla (Tabla 5):

NEOADYUVANCIA <i>ESTADIO III</i> <i>T4</i>
ADYUVANCIA <i>ESTADIO I</i> <i>ESTADIO II</i> <i>ESTADIO III</i> <i>ESTADIO IV</i>

Tabla 5: Esquema de los diferentes supuestos para el tratamiento oncológico.

PROTOCOLO QUIRÚRGICO

En cuanto a los datos de la cirugía se recoge, en primer lugar, el tipo de intervención realizada: resección anterior de recto, amputación abdominoperineal o intervención de Hartmann, contemplando también la posibilidad de intervenciones paliativas o cirugía local. Por otra parte se valora si se ha realizado la ETM (con especial interés en tumores de recto medio o inferior), la vía de abordaje (laparoscópica o abierta), si el tumor se ha perforado o no y en qué tipo de intervención, si la cirugía ha sido con intención curativa o paliativa, la mortalidad y las posibles complicaciones, todo ello recogido en la siguiente tabla:

TIPO DE INTERVENCIÓN	RESECCIÓN LOCAL RESECCIÓN ANTERIOR DE RECTO ALTA BAJA AMPUTACIÓN ABDOMINOPERINEAL PRONO SUPINO PROCTOCOLECTOMÍA INTERVENCIÓN DE HARTMENN ESTOMA DE DERIVACIÓN (PALIATIVO) EXANTERACIÓN OTRAS
EXÉRESIS DEL MESORRECTO (ETM)	PARCIAL TOTAL NO REALIZADA
ETM EN TUMORES DE TERCIO MEDIO/INFERIOR	PARCIAL TOTAL NO REALIZADA
VIA DE ABORDAJE	LAPAROSCÓPICA LAPAROSCÓPICA CONVERTIDA ABIERTA
PERFORACIÓN DEL TUMOR	RESECCIÓN ANTERIOR ALTA RESECCIÓN ANTERIOR BAJA AMPUTACIÓN ABDOMINOPERINEAL PROCTOCOLECTOMÍA INTERVENCIÓN DE HARTMANN
INTENCIÓN QUIRÚRGICA	CURATIVA PALIATIVA
ESTOMA DE DERIVACIÓN (*)	SI NO
MORTALIDAD QUIRÚRGICA (A LOS 30 DÍAS)	SI NO
COMPLICACIONES	INFECCIÓN HERIDA OPERATORIA INFECCIÓN EN PERINÉ (EN AMPUTACIÓN) DEHISCENCIA ANASTOMÓTICA ABSCESO ABDOMINAL REINTERVENCIONES

Tabla 6: Esquema de los diferentes parámetros recogidos en el protocolo quirúrgico. (*): en casos de resección anterior de recto.

ESTUDIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

El estudio de la pieza quirúrgica es fundamental, no sólo de cara a planificar los diferentes tratamientos posteriores y revisar posible factores pronósticos o predictivos de respuesta, sino también, sobre todo en este estudio, para hacer el control de calidad de la cirugía en cuanto a ETM, comparar los datos obtenidos con los datos radiológicos pre-intervención y valorar el grado de respuesta en los casos que hayan recibido tratamiento neoadyuvante (médico o radioterápico). Así pues, el patólogo tiene una interacción directa con el cirujano, el radiólogo, el oncólogo médico y el radioterapeuta, y de su informe se derivarán consecuencias directas para la conducta a seguir con la enfermedad.

De todos los datos posibles en el estudio de la pieza quirúrgica, en este estudio se recogen los relativos a la calidad de resección del mesorrecto, el grado de regresión tumoral, la afectación del margen circunferencial y/o distal, la afectación ganglionar y el estadio patológico. Todo ello queda resumido en la siguiente tabla (Tabla 7):

CALIDAD DE RESECCIÓN DEL MESORRECTO

SATISFACTORIA

PARCIALMENTE SATISFACTORIA

INSATISFACTORIA

GRADO DE REGRESIÓN TUMORAL (*)

GR1: Ausencia de carcinoma (remisión completa).

GR2: Algunas células neoplásicas/glándulas residuales aisladas.

GR3: Predominio de fibrosis sobre tumor.

GR4: Regresión parcial con predominio de tumor sobre fibrosis

GR5: Tumor sin cambios.

MARGEN QUIRÚRGICO

CIRCUNFERENCIAL

AFECTO

LIBRE

	DISTAL
	AFECTO
	LIBRE
	TIPO DE RESECCIÓN
	R0
	R1
	R2
GANGLIOS LINFÁTICOS	
	AISLADOS
	AFECTADOS
ESTADIO	
	ESTADIO 0
	ESTADIO I
	ESTADIO II
	ESTADIO III
	ESTADIO IV

Tabla 7: Esquema de los diferentes parámetros recogidos en el estudio patológico de la pieza quirúrgica. (*): en casos tratados con neoadyuvancia.

SEGUIMIENTO

Cálculos realizados en pacientes con cirugía radical desde el inicio hasta el año 2013. Se recogen datos relativos a posibles recidivas y supervivencia de los pacientes, de acuerdo a la siguiente tabla (Tabla 8):

RECIDIVA	
	LOCAL
	SISTÉMICA
	LOCAL + SISTÉMICA
ESTADO DEL PACIENTE	
	VIVO
	MUERTO

Tabla 8: Esquema de las diferentes variables recogidas en el seguimiento de los pacientes operados por cáncer de recto.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha realizado un análisis descriptivo de todas las variables estudiadas. Las variables cuantitativas se han resumido en forma de medias, medianas, desviación estándar e intervalo intercuartílico. Las variables categóricas se presentan en frecuencias absolutas y relativas.

Se han evaluado las asociaciones entre las variables explicativas o posibles factores de riesgo con los tiempos desde el diagnóstico hasta la recurrencia local (recidiva), la metástasis y la supervivencia. Se han estimado curvas de Kaplan-Meier que se han comparado mediante la prueba de *logrank* (). Se han obtenido los cocientes de riesgo (hazard-ratio) y sus intervalos de confianza (95%).

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- OSNA Y GANGLIO CENTINELA

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE E HISTOPATOLOGÍA TUMORAL.

Se incluyeron para este estudio prospectivo y multicéntrico un total de 103 pacientes con tumores pN0 confirmados histopatológicamente (estadios I y II de la UICC). La media de edad fue de 71 años con un rango entre 23 y 92 años. 81 (78.6%) de estos pacientes se sometieron a cirugía abierta mientras que en 22 (21.4%) casos la cirugía fue por laparoscopia. En todos los pacientes se llevó a cabo una escisión completa del tumor sin que se identificara tumor residual (resección R0). La longitud media de las piezas de resección quirúrgica fue de 29.5 cm con un rango entre 8 y 73 cm. La mayoría de los tumores se localizaron en ciego (19.4%), colon ascendente (33%) o colon sigmoideo (20.4%). El tamaño medio del tumor era de 4 cm (rango: 0.5-16). La mayoría de los pacientes tenían tumores infiltrantes de subserosa (56.3%, T3) o de muscular propia (27.2%, T2). En el 80% de los casos se trataba de carcinomas moderadamente diferenciados (G2) y no mostraban invasión linfática (91.3%) ni vascular (93.2%) o perineural (85.9%). (Tabla 9).

Características	Pacientes		OSNA negativo		OSNA positivo		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Total	103	(100)	77	(74.8)	26	(25.2)	
Sexo							
Femenino	49	(47.6)	35	(71.4)	14	(28.6)	
Masculino	54	(52.4)	42	(77.8)	12	(22.2)	0.50
Edad							
Media (rango)	71	(23-92)	71	(23-90)	71	(50-92)	0.8
Cirugía							
Abierta	81	(78.6)	58	(71.6)	23	(28.4)	
Laparoscopia	22	(21.4)	19	(86.4)	3	(13.6)	0.27
Longitud de colon resecado (cm)							
Media (rango)	29.5	(8-73)	27	(8-73)	33.5	(15-65)	0.27
Localización del tumor							
Ciego	20	(19.4)	12	(60)	8	(40)	
Colon ascendente	34	(33)	27	(79.4)	7	(20.6)	
Ángulo hepático	2	(1.9)	2	(100)	0	(0)	
Colon transverso	7	(6.8)	5	(71.4)	2	(28.6)	
Ángulo esplénico	1	(1)	1	(100)	0	(0)	
Colon descendente	9	(8.7)	5	(55.6)	4	(44.4)	
Colon sigmoide	30	(29.1)	25	(83.3)	5	(16.7)	0.34
Tamaño tumoral (cm)							
< 5 cm	65	(63.1)	50	(76.9)	15	(23.1)	
≥ 5 cm	38	(36.9)	27	(71.1)	11	(28.9)	0.65
Media, cm (rango)	4	(0.5 -16)	4	(0.7-12)	4.5	(0.5-16)	

Categoría-T							
T1	9	(8.7)	7	(77.8)	2	(22.2)	
T2	28	(27.2)	24	(85.7)	4	(14.3)	
T3	58	(56.3)	41	(70.7)	17	(29.3)	
T4	8	(7.8)	5	(62.5)	3	(37.5)	0.18
Grado histológico							
Bien (G1)	5	(4.9)	4	(80)	1	(20)	
Moderado (G2)	80	(77.7)	57	(71.2)	23	(28.8)	
Poco (G3)	18	(17.5)	16	(88.9)	2	(11.1)	0.32
Invasión linfática							
Si	9	(8.7)	6	(66.7)	3	(33.3)	
No	94	(91.3)	71	(75.5)	23	(24.5)	0.69
Invasión vascular							
Si	7	(6.8)	5	(71.4)	2	(28.6)	
No	96	(93.2)	72	(75)	24	(25)	1.0
Invasión perineural (Pn)							
Si	11	(14.1)	7	(63.6)	4	(36.4)	0.27
No	67	(85.9)	53	(79.1)	14	(20.9)	
Not determined	25						
R (status de la resección)							
R0	103	(100)	77	(74.8)	26	(25.2)	
R1	0	(0)	0	(0)	0	(0)	NS
LN de tejido en fresco para OSNA							
Media, n (rango)	16 (1-46)		14 (1-39)		19 (4-46)		
< 12 LN	43	(41.7)	37	(86.0)	6	(14)	
≥12 LN	60	(58.3)	40	(66.7)	20	(33.3)	0.04
LN del resto de tejido fijado en formol							
Media; n (rango)	5 (0-28)		5 (0-28)		4 (0-15)		
< 7	60	(58.3)	43	(71.7)	17	(28.3)	
≥7	43	(41.7)	34	(79.1)	9	(20.9)	0.49

Tabla 9: Datos de los pacientes, características del tumor y criterios histopatológicos. NS: no significativo; LN: ganglios linfáticos.

En todos los tumores primarios fue analizada la positividad inmunohistoquímica para CK19 como control de calidad. En todas las muestras la expresión proteica de CK19 mediante tinción inmunohistoquímica fue positiva, a excepción de un caso que contenía menos de un 10% de células positivas. Sin embargo, en dicho tumor se identificó un ganglio linfático histopatológicamente positivo con tinción HE y, por lo tanto, se excluyó del estudio.

DISECCIÓN DE GANGLIOS LINFÁTICOS

Fueron disecados una media de 14 ganglios linfáticos (rango: 1-46) en las piezas de resección quirúrgica en fresco. La media de ganglios disecados en pacientes operados con cirugía abierta (17) fue significativamente mayor que la de los aislados en pacientes sometidos a laparoscopia (11) con una $p=0.007$.

Después de la fijación en formol del tejido restante se identificaron una media de 5 ganglios linfáticos adicionales (rango: 0-28), que se incluyeron únicamente para el estudio histopatológico.

El número total de ganglios disecados (incluyendo tanto los ganglios en fresco como los adicionales en formol) en cirugía abierta y en laparoscopia fue de 22 y 16 respectivamente. En total, en los 103 casos, se estudiaron un conjunto de 1594 ganglios linfáticos con una media de 14 ganglios por paciente (rango: 5-46). En 101 de los 103 pacientes se aislaron un número superior a 12 ganglios linfáticos. Solamente en dos casos se aislaron 10 y 11 ganglios linfáticos respectivamente.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR CON EL MÉTODO OSNA

De 103 pacientes (catalogados histológicamente como pN0) 26 de ellos fueron positivos para OSNA, dando un índice de **supraestadificación molecular de 25.2%**.

De estos 26 pacientes, 6 de ellos estaban clasificados previamente como estadio I UICC (6/37, 16.2%) y los otros 20 eran tumores en estadio II UICC (20/66, 30.3%)

Respecto al número de ganglios linfáticos positivos para OSNA, en los 26 pacientes hubo 19 con un único ganglio positivo, 3 pacientes con 2 ganglios positivos, 3 pacientes con 3 ganglios y un único caso con 4 ganglios positivos para OSNA (tabla 2). Los casos con 2 o más ganglios positivos simultáneos para OSNA se dieron todos en tumores clasificados como pT3 en el pTNM, es decir tumores infiltrantes de subserosa. Además, 9 de los 10 pacientes con OSNA (++) se encontraba en dicho grupo T3 (tabla 2).

Respecto al número de copias de mRNA de CK19, de un total de 38 ganglios linfáticos OSNA positivos, en 28 se obtuvieron un número de copias entre 250-4999/ μ L (+), indicando una carga tumoral pequeña, mientras que en los 10 ganglios restantes se obtuvieron números de copias superiores a 5000/ μ L (++), cosa que correspondería a cargas tumorales elevadas (Croner et al, 2010).

Se estudió la correlación entre la presencia de supraestadificación por OSNA y diversos criterios clínico-patológicos como el sexo, la edad, la longitud de la pieza de resección quirúrgica, el grado de diferenciación, el estadio tumoral y la invasión vasculolinfática y perineural (Tabla 10). En

pacientes en los que se identificaron menos de 12 ganglios linfáticos, que se encontraban principalmente en el grupo de los tumores obtenidos a través de procedimientos laparoscópicos, el porcentaje de casos OSNA positivos era considerablemente inferior al de los pacientes con más de 12 ganglios linfáticos aislados ($p=0.04$). De los 38 ganglios linfáticos positivos, 22 se localizaron a < 5 cm del tumor, mientras que 7 se encontraban a > 5 cm. En Los 9 ganglios restantes no se disponía de la información respecto a su localización de los mismos.

Categoría-T	Pacientes; (n)	Pacientes supraestadificados por OSNA; (n)	LN's positivos para OSNA; n total (nº de pacientes)	OSNA (+) o (++)
T1	9	2	2 (1)	1 + 1 ++
T2	28	4	4 (1)	4 +
T3	58	17	10 (1) 3 (2) 3 (3) 1 (4)	8 + 9 ++
T4	8	3	3 (1)	3 +

Tabla 10: Resultados del nivel T de carcinomas de colon y ganglios linfáticos positivos con OSNA (LN). Los resultados de OSNA designados como (++) tienen un número de copias de CK19 mRNA > 5000 , los designados como (+) entre 250-4999 copias.

RESULTADOS DEL MAPEO PARA LA DETECCIÓN DE GANGLIO CENTINELA “EX VIVO” Y POSTERIOR ESTUDIO MOLECULAR CON EL MÉTODO OSNA.

Una vez recogidos todos los datos de los 22 pacientes, éstos se distribuyen en una tabla (Tablas 11 y 12).

Patient ID	SLN	non-SLN	Both SLN+non-SLN	Additonal LN/formalin	Additonal LN/formalin ALL	OSNA + formalin	OSNA + formalin ALL
L-1	3	2	5	5	5	10	10
L-2	4	10	14	11	11	25	25
L-3	5	10	15	5	5	20	20
L-4	5	17	22	0	0	22	22
L-5	8	10	18	4	4	22	22
L-6	2	9	11	0	0	11	11
L-7	1	9	10	7	7	17	17
L-8	2	4	6	4	4	10	10
L-9	2	16	18	2	2	20	20
L-10	8	3	11	1	1	12	12
L-11	4	16	20	0	0	20	20
L-12	2	13	15	2	2	17	17
L-13	3	13	16	1	1	17	17
L-14	3	8	11	2	2	13	13
L-15	2	5	7	5	5	12	12
L-16	3	6	9	3	3	12	12
L-17	3	19	22	6	6	28	28
L-18	2	3	5	8	8	13	13
L-19	3	8	11	4	4	15	15
L-20	7	4	11	1	1	12	12
L-21	5	10	15	0	0	15	15
L-22	3	11	14	3	3	17	17
mean	3,6	9,4	13,1	3,4	7,2	16,4	22,5
range	1-8	2-19	5-22	0-11			
sum	80,00	206,00	286,00	74,00	74,00	360,00	2275,00

Tabla 11: Tabla de recogida de datos. Se indica en cada caso el número de GC, GNC y ganglios aislados en la pieza fijada, así como la suma total de ganglios.

Resultados

Patient ID	SLN +/-	non-SLN +/-	upstaging	mapping successful yes/no
L-1	-	-	no	yes
L-2	1+	-	yes	yes
L-3	-	-	no	yes
L-4	-	-	no	yes
L-5	-	-	no	yes
L-6	-	-	no	yes
L-7	-	-	no	yes
L-8	-	-	no	yes
L-9	-	-	no	yes
L-10	-	-	no	yes
L-11	-	2+	yes	no
L-12	-	-	no	yes
L-13	-	-	no	yes
L-14	-	-	no	yes
L-15	-	-	no	yes
L-16	-	-	no	yes
L-17	-	-	no	yes
L-18	-	-	no	yes
L-19	-	-	no	yes
L-20	1	-	Yes	yes
L-21	-	-	no	yes
L-22	-	-	no	yes
mean				

3/22=13.6 20/22=90.9 2/3=66.6%
Detection rate: 100%

Tabla 12: Tabla de recogida de datos. Se indica en cada caso el resultado del análisis molecular de OSNA para cada ganglio aislado.

Del estudio de estos 22 casos podemos deducir que el método para detección del ganglio centinela en las piezas quirúrgicas “ex vivo” se ha realizado con éxito en 90.9 % de los casos ya que sólo hubo un caso en el que se detectó una micrometástasis en ganglios previamente identificados como GNC (Tabla 13). Por lo tanto, es una prueba con una especificidad óptima (100%) y un valor predictivo positivo del 100%, es decir, en nuestro estudio no se han encontrado falsos positivos. En este grupo de pacientes el índice de supraestadificación fue del 13.6 %.

La detección del falso negativo (caso L-11) comentado anteriormente con lleva que la sensibilidad de la prueba sea del 66.6%, aunque el valor

predictivo positivo sea del igualmente alto (95%), es decir, sólo 1 de los 20 casos en los que no se detectó micrometástasis en los GC, presentó metástasis en un GNC (Tabla 14).

	Metástasis (OSNA +)	No metástasis (OSNA -)	
GC con metástasis	2	0	2
GC sin metástasis	1	19	20
	3	19	22

Tabla 13: Tabla de distribución de los casos. Se agrupan los casos según el resultado del estudio molecular y la presencia de metástasis en GC.

Especificidad	19/19=100%
Sensibilidad	2/3=66.6%
Valor predictivo positivo	2/2=100%
Valor predictivo negativo	19/20=95%

Tabla 14: Resultados de la prueba de mapeo para la detección de ganglio centinela.

2.- ESTUDIO DEL GEN K-Ras

1.- Resultados globales

Una vez recogidos todos los datos a lo largo de los primeros 7 años del estudio, se han obtenido los siguientes resultados (Tabla 15), en forma de datos descriptivos. Se indican el número de casos totales en cada apartado y entre paréntesis el porcentaje respecto al total.

	TOTAL
	N(%)
Edad	66.9 (9.93) 205
Sexo:	205
Hombre	127 (62.0%)
Mujer	78 (38.0%)
Metástasis_dx:	199
No	85 (42.7%)
Sí	114 (57.3%)
Metástasis_loc:	205
NI	13 (6.34%)
Hepáticas	120 (58.5%)
Pulmonares	29 (14.1%)
Hep/Pulm	2 (0.98%)
Ganglios	11 (5.37%)
Peritoneales	17 (8.29%)
Óseas	1 (0.49%)
Otras	12 (5.85%)
Cir_tumor:	197
Sí	145 (73.6%)
No	52 (26.4%)
Qt_adyuvante:	197
Sí	93 (47.2%)
No	104 (52.8%)
Qt_neoadyuvante:	197
Sí	32 (16.2%)
No	165 (83.8%)
Rt_adyuvante:	199
Sí	20 (10.1%)
No	179 (89.9%)
Rt_neoadyuvante:	197
Sí	24 (12.2%)
No	173 (87.8%)

Recaída:		194
Sí	103 (53.1%)	
No	91 (46.9%)	
Local_Distancia:		114
Local	7 (6.14%)	
Local/Distancia	19 (16.7%)	
Distancia	88 (77.2%)	
Exitus:		200
Sí	148 (74.0%)	
No	52 (26.0%)	
Seguimiento:	32.00 [19.00-52.50]	187
Cirugia_M1:		191
Sí	53 (27.7%)	
No	138 (72.3%)	
Qt_M1:		190
Sí	185 (97.4%)	
No	5 (2.63%)	
Tiempo_Meta		
Media (IC)	9.45 (17.6)	194
Tiempo_éxitus		
Mediana (IIQ)	31.13 [19.44-51.52]	200
Tiempo_ultvisit	40.2 (31.2)	200
Kras:		200
Nativo	116 (58.0%)	
Mutado	84 (42.0%)	
Mutación:		205
Nativo	122 (59.5%)	
12	2 (0.98%)	
12ALA	2 (0.98%)	
12ARG	1 (0.49%)	
12ASP	32 (15.6%)	
12CYS	12 (5.85%)	
12SER	3 (1.46%)	
12VAL	23 (11.2%)	
13ASP	8 (3.90%)	
LOCALIZACION:		155
Ciego	14 (9.03%)	
Colon derecho	19 (12.3%)	
C. transverso	3 (1.94%)	
C. izquierdo	3 (1.94%)	
Sigma	59 (38.1%)	
Recto	57 (36.8%)	
TAMAÑO	4.03 (1.98)	102

Resultados

TIP_HISTOLOGICO:		137
ADC NOS	124 (90.5%)	
ADC coloide	11 (8.03%)	
ADC signet ring 2	2 (1.46%)	
GRADO_HISTOLOGICO:		135
Bajo grado	109 (80.7%)	
Alto grado	26 (19.3%)	
FACTORES_RIESGO:		126
No	68 (54.0%)	
Sí	58 (46.0%)	
npT:		205
1	2 (0.98%)	
2	12 (5.85%)	
3	68 (33.2%)	
4	51 (24.9%)	
NI	72 (35.1%)	
npN:		205
0	37 (18.0%)	
1	45 (22.0%)	
2	49 (23.9%)	
NI	74 (36.1%)	
Estadio:		205
NI	73 (35.6%)	
Estadio I	9 (4.39%)	
Estadio II	28 (13.7%)	
Estadio III	95 (46.3%)	

Tabla 15: Resultados globales en los pacientes con estudio mutacional del gen K-Ras.

La media de edad de los pacientes está en 66.9 años, con un predominio de hombres sobre mujeres (62.0%). La mayoría de las metástasis se localizan en el hígado (58.5%) seguido del pulmón (14.1 %).

Los tumores se localizaron preferentemente a nivel de recto-sigma (63.1 %) y colon ascendente (22.7%). Los tumores exclusivamente rectales constituyen un 35.0 %.

A pesar de tratarse de un grupo de pacientes con un tumor avanzado, en un 73.6 % de ellos se pudo practicar la cirugía del tumor y el estudio histopatológico del mismo, mientras que en el resto se optó por tratamientos únicamente de tipo quimio o radioterapia. Además, en un

grupo seleccionado de tumores de recto se optó por tratamiento neoadyuvante con quimio (16.2 %) o radioterapia (12.2 %). En un 97.4 % de los pacientes se realizó tratamiento quimioterápico sobre las metástasis mientras que sólo en un 27 % de los casos se pudo realizar cirugía de las mismas.

Llama la atención la presencia de un elevado número de *exitus* en el momento de cerrar el estudio: 74.0 %, con una mediana de seguimiento de 32.0 meses y una mediana de 31.13 meses hasta el momento del fallecimiento.

En cuanto al estudio molecular de K-Ras, un 58.0 % de las muestras analizadas presentaron K-Ras nativo, mientras que el 42.0 % restante presentó algún tipo de mutación. Las mutaciones más frecuentes fueron las localizadas en posición 12ASP (15.6 %) y 12VAL (11.2 %).

En las piezas quirúrgicas, los tumores presentaron un tamaño medio de 4.03 cm y en el 90.5 % se trataba de un ADC de tipo convencional, mientras que el resto fueron ADC coloides o mucinosos (8.03 %) o ADC con células “en anillo de sello” (1.46 %). En cuanto al grado histológico, el 80.7 % eran tumores de bajo grado. Un 46.0 % de los tumores tenían factores histológicos de alto riesgo, como permeación vascular, linfática o nerviosa.

En cuanto al estadio TNM, la mayoría de los casos eran pT3 (33.2 %) o pT4 (24.9 %) con afectación ganglionar (pN1 ó pN2) en un 45.9 % de los mismos, siendo predominantemente catalogados como Estadio III (46.3 %) en el estudio histopatológico de las piezas quirúrgicas.

2.- Resultados respecto a la presencia de metástasis

Se han obtenido los siguientes resultados (Tabla 16) comparando el grupo de pacientes que presentaban metástasis en el momento del diagnóstico (1) del tumor con respecto al resto (0). Se indican el número de casos totales en cada apartado y entre paréntesis el porcentaje respecto al total.

	0 N=85	1 N=114	p global
Edad	69.0 [60.0;76.0]	68.0 [62.0;74.0]	0.957
Sexo:			0.053
Hombre	60 (70.6%)	64 (56.1%)	
Mujer	25 (29.4%)	50 (43.9%)	
Metastasis_loc:			<0.001
NI	5 (5.88%)	2 (1.75%)	
Hepáticas	33 (38.8%)	87 (76.3%)	
Pulmonares	23 (27.1%)	6 (5.26%)	
Hep/pulm	1 (1.18%)	1 (0.88%)	
Ganglios	8 (9.41%)	3 (2.63%)	
Peritoneo	7 (8.24%)	10 (8.77%)	
Óseas	0 (0.00%)	1 (0.88%)	
Otras	8 (9.42%)	4 (3.51%)	
Cir_tumor:			<0.001
Sí	81 (95.3%)	63 (56.8%)	
No	4 (4.71%)	48 (43.2%)	
Qt_adyuvante:			<0.001
Sí	67 (79.8%)	25 (22.3%)	
No	17 (20.2%)	87 (77.7%)	
Qt_neoadyuvante:			0.008
Sí	21 (25.0%)	11 (9.82%)	
No	63 (75.0%)	101 (90.2%)	
Rt_adyuvante:			<0.001
Sí	18 (21.2%)	2 (1.79%)	
No	67 (78.8%)	110 (98.2%)	
Rt_neoadyuvante:			<0.001
Sí	19 (22.6%)	5 (4.46%)	
No	65 (77.4%)	107 (95.5%)	
Recaída:			<0.001
Sí	73 (85.9%)	29 (27.1%)	
No	12 (14.1%)	78 (72.9%)	
SG, mediana [IIQ]	44.0 [28.5;70.5]	25.0 [17.0;42.2]	<0.001
GRADO_HISTOLOGICO:			0.031
Bajo grado	63 (88.7%)	45 (72.6%)	
Alto grado	8 (11.3%)	17 (27.4%)	

FACTORES_RIESGO:			0.001
No	45 (67.2%)	21 (36.8%)	
Sí	22 (32.8%)	36 (63.2%)	
pT:			<0.001
1	1 (1.18%)	1 (0.88%)	
2	10 (11.8%)	2 (1.75%)	
3	37 (43.5%)	31 (27.2%)	
4	23 (27.1%)	25 (21.9%)	
NI	14 (16.5%)	55 (48.2%)	
pN:			<0.001
0	20 (23.5%)	16 (14.0%)	
1	27 (31.8%)	18 (15.8%)	
2	24 (28.2%)	24 (21.1%)	
NI	14 (16.5%)	56 (49.1%)	
Estadio:			<0.001
NI	13 (15.3%)	56 (49.1%)	
Estadio I	7 (8.24%)	2 (1.75%)	
Estadio II	13 (15.3%)	14 (12.3%)	
Estadio III	52 (61.2%)	42 (36.8%)	

Tabla 16: Resultados de los pacientes con estudio mutacional de K-Ras. Presencia de metástasis en el momento del diagnóstico.

Se observa un predominio de mujeres en el grupo de metástasis, con un valor $p=0.053$ en el límite de la significación estadística. Se observa una asociación entre la localización en el recto y la no presencia de metástasis ($p=0.003$).

Igualmente, la presencia de metástasis en el diagnóstico del tumor se asocia a que éstas metástasis estén localizadas en hígado ($p<0.001$).

En cuanto al tratamiento, el hecho de no presentar metástasis se asocia a tratamiento quirúrgico mientras que entre los que no se sometían a la cirugía hay una prevalencia más alta de tumores metastásicos ($p<0.001$). Lo mismo ocurre con la quimioterapia y radioterapia adyuvantes: se aplican a pacientes sin metástasis, mientras que el grupo en el que no se han realizado estos tratamientos está compuesto básicamente de pacientes con metástasis ($p<0.001$). Lo mismo es extrapolable a los tumores de recto sometidos a tratamiento neoadyuvante con quimioterapia ($p=0.008$) y/o radioterapia ($p<0.001$).

La media de meses de seguimiento fue significativamente mayor en los casos sin metástasis ($p < 0.001$).

En cuanto al estudio histopatológico, hay una asociación significativa entre el grado histológico y la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico, con un predominio de tumores de alto grado en el grupo de metástasis ($p = 0.031$). De igual modo, los casos sin factores de riesgo eran más prevalentes entre el grupo de no metástasis y los casos con factores histológicos de riesgo se asociaban al hecho de presentar metástasis ($p = 0.01$).

Los casos localmente poco avanzados (pT2) o sin metástasis ganglionares (pN0) fueron más frecuentes entre el grupo sin metástasis ($p < 0.001$). Precisamente en aquellos casos donde no se pudo tipificar el TNM patológico ya que no fueron quirúrgicos, se describe una asociación con presencia de metástasis ($p < 0.001$).

3.- Resultados respecto a la supervivencia

Se han obtenido los siguientes resultados (Tabla 17) comparando el grupo de pacientes que estaban vivos en el momento de cerrar el estudio con respecto a pacientes que fueron *exitus*. Se indican el número de casos totales en cada apartado y entre paréntesis el porcentaje respecto al total.

	Vivos N=52	Muertos N=147	Cociente de riesgo (HR) IC 95%	valor p
Edad, mediana [IIQ]	66.5 [62.0;74.2]	69.0 [60.5;74.5]	1.00 [0.98;1.01]	0.650
Sexo:				
Hombre	28 (53.8%)	94 (63.9%)	Ref.	Ref.
Mujer	24 (46.2%)	53 (36.1%)	0.71 [0.51;1.00]	0.050
Metastasis_dx:				
No	21 (40.4%)	63 (43.4%)	Ref.	Ref.
Sí	31 (59.6%)	82 (56.6%)	1.99 [1.41;2.81]	<0.001
Metastasis:				
NI	3 (5.77%)	5 (3.40%)	Ref.	Ref.
NA	0 (0.00%)	1 (0.68%)	1.47 [0.17;12.7]	0.726
Hepáticas	32 (61.5%)	87 (59.2%)	1.46 [0.59;3.62]	0.412
Hep/pulm	0 (0.00%)	2 (1.36%)	3.53 [0.67;18.4]	0.135
Pulmonares	5 (9.62%)	24 (16.3%)	0.96 [0.36;2.52]	0.930
Ganglios	2 (3.85%)	9 (6.12%)	1.78 [0.60;5.34]	0.301
Peritoneo	6 (11.5%)	11 (7.48%)	1.43 [0.50;4.14]	0.504
Óseas	0 (0.00%)	1 (0.68%)	18.7 [2.06;170]	0.009
Otras	4 (7.69%)	7 (4.76%)	0.86 [0.27;2.73]	0.802
Cir_tumor:				
Sí	49 (94.2%)	95 (66.4%)	Ref.	Ref.
No	3 (5.77%)	48 (33.6%)	5.36 [3.64;7.89]	0.000
Qt_adyuvante:				
Sí	32 (61.5%)	60 (42.0%)	Ref.	Ref.
No	20 (38.5%)	83 (58.0%)	2.27 [1.61;3.20]	<0.001
Rt_adyuvante:				
Sí	4 (7.69%)	15 (10.4%)	Ref.	Ref.
No	48 (92.3%)	129 (89.6%)	1.76 [1.02;3.03]	0.041
Recaida:				
Sí	26 (50.0%)	76 (53.9%)	Ref.	Ref.
No	26 (50.0%)	65 (46.1%)	1.67 [1.19;2.35]	0.003
SG	42.5 [26.8;69.5]	29.0 [18.0;46.0]	0.85 [0.84;0.87]	<0.001
Mutacion:				
Nativo	33 (63.5%)	83 (56.5%)	Ref.	Ref.
12	0 (0.00%)	2 (1.36%)	0.86 [0.21;3.51]	0.834
12ALA	0 (0.00%)	2 (1.36%)	1.26 [0.31;5.16]	0.744
12ARG	1 (1.92%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.994
12ASP	6 (11.5%)	26 (17.7%)	1.02 [0.65;1.58]	0.940
12CYS	3 (5.77%)	9 (6.12%)	1.27 [0.64;2.54]	0.499
12SER	1 (1.92%)	2 (1.36%)	8.67 [2.04;36.7]	0.003
12VAL	5 (9.62%)	18 (12.2%)	1.03 [0.62;1.73]	0.900
13ASP	3 (5.77%)	5 (3.40%)	0.62 [0.25;1.53]	0.296
TIP_HISTOLOGICO:				
ADC NOS	42 (97.7%)	81 (87.1%)	Ref.	Ref.
Coloide	1 (2.33%)	10 (10.8%)	2.28 [1.17;4.46]	0.015
Signet ring	0 (0.00%)	2 (2.15%)	11.7 [2.73;49.9]	0.001
GRADO_HISTOLOGICO:				
Bajo grado	36 (83.7%)	72 (79.1%)	Ref.	Ref.
Alto grado	7 (16.3%)	19 (20.9%)	2.57 [1.52;4.35]	<0.001
npT:				
1 + 2	4 (7.69%)	10 (6.80%)	Ref.	Ref.
3	24 (46.2%)	43 (29.3%)	0.95 [0.48;1.90]	0.890
4	15 (28.8%)	35 (23.8%)	1.14 [0.56;2.30]	0.724
NI	9 (17.3%)	59 (40.1%)	2.51 [1.28;4.93]	0.008
npN:				
0	15 (28.8%)	22 (15.0%)	Ref.	Ref.
1	15 (28.8%)	30 (20.4%)	1.02 [0.58;1.78]	0.952
2	13 (25.0%)	35 (23.8%)	1.41 [0.82;2.40]	0.211
NI	9 (17.3%)	60 (40.8%)	2.67 [1.63;4.38]	<0.001

Resultados

Estadio:

NI	9 (17.3%)	59 (40.1%)	Ref.	Ref.
Estadio I	3 (5.77%)	6 (4.08%)	0.45 [0.19;1.04]	0.061
Estadio II	12 (23.1%)	16 (10.9%)	0.33 [0.19;0.58]	<0.001
Estadio III	28 (53.8%)	66 (44.9%)	0.44 [0.31;0.63]	<0.001

Tabla 17: Resultados de los pacientes con estudio mutacional de K-Ras. Análisis bivariable de los factores relacionados con la supervivencia de los pacientes con estudio mutacional del gen K-Ras. *Ref: categoría de referencia.*

En cuanto a la supervivencia, la mortalidad está más asociada a sexo masculino ($p=0.048$) y a presencia de metástasis en el momento del diagnóstico ($HR=1.99$; $p<0.001$). También se asocia estadísticamente a presencia de metástasis simultáneas en hígado y pulmón y a presencia de metástasis óseas.

En cuanto al tratamiento, la mortalidad es mucho más prevalente en el grupo de pacientes en los que no se ha realizado intervención quirúrgica ($HR=5.36$; $p<0.001$). De igual manera el grupo de pacientes en los que no se ha realizado adyuvancia tienen más riesgo de morir, tanto si analizamos la quimioterapia ($HR=2.27$; $p<0.001$) como la radioterapia ($HR=1.76$; $p=0.038$).

Respecto a la cirugía de las metástasis la mortalidad es mucho más prevalente en el grupo de pacientes en los que no se ha realizado intervención quirúrgica ($HR=3.62$; $p<0.001$).

Hay diferencias significativas respecto a los meses de seguimiento, de manera que el número de meses es superior si el paciente no es *exitus* ($HR=0.85$; $p<0.001$).

No hay diferencias significativas en cuanto a supervivencia y la presencia o no de mutación. En cambio, si consideramos los pacientes con K-Ras mutado, hay una asociación significativa entre la mutación en posición 12SER y *exitus*, en relación a los pacientes sin mutación ($HR=8.67$; $p=0.003$). La localización del tumor y el tamaño del mismo no presentaron asociaciones significativas con la supervivencia. Llama la atención el

hecho de que hay relación significativa entre tipo histológico y *exitus*, siendo éstos más frecuentes entre los grupos de ADC coloide (HR=2.28; p=0.015) y, especialmente, en la variedad de células “en anillo de sello” (HR=11.7; p=0.001). También los tumores de alto grado ofrecen peores cifras de supervivencia (HR=2.57; p<0.001).

Nuevamente, en aquellos casos donde no se pudo tipificar el TNM patológico ya que no fueron quirúrgicos, se describe una asociación con un peor índice de supervivencia (p<0.001).

Curva de supervivencia (Fig. 24) en el grupo de pacientes en los que se estudia el estado mutacional de K-Ras:

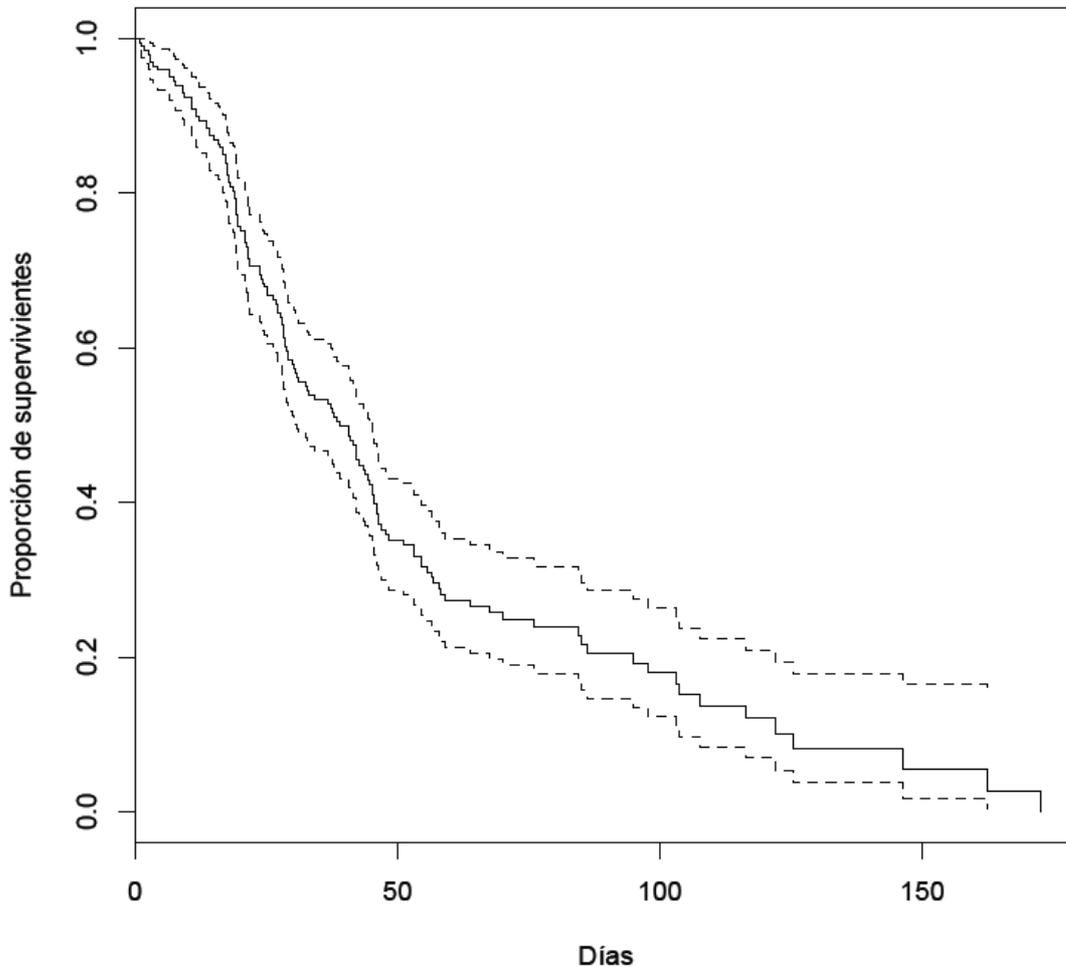


Figura 24: Resultados de los pacientes con estudio mutacional de K-Ras. Curva de supervivencia Kaplan-Meier e intervalo de confianza 95%.

Finalmente se realiza con estudio multivariable (Tabla 18) siguiendo el modelo de Cox, comparando entre sí las variables: tipo de mutación, tipo histológico del tumor y grado histológico, obteniéndose los siguientes resultados:

	Cociente de riesgos (HR)	Intervalo de confianza del HR (95%)
Cir_tumor1	6.416e+00	(3.9164, 10.510)
Mutacion12	1.559e+00	(0.3746, 6.485)
Mutacion12ALA	1.815e+00	(0.4154, 7.926)
Mutacion12ARG	9.264e-07	(0.0000, Inf)
Mutacion12ASP	9.887e-01	(0.6166, 1.585)
Mutacion12CYS	2.346e+00	(1.1389, 4.834)
Mutacion12SER	8.203e+00	(1.8302, 36.766)
Mutacion12VAL	7.756e-01	(0.4558, 1.320)
Mutacion13ASP	7.507e-01	(0.2674, 2.108)
ADC MUCINOSO	2.308e+00	(1.1017, 4.836)
ANILLO DE SELLO	5.467e+00	(1.1676, 25.601)
ADC CONVENCIONAL	8.964e-01	(0.2121, 3.788)
ALTO GRADO	2.314e+00	(1.3183, 4.061)
BAJO GRADO	1.654e+00	(0.4110, 6.653)

	Valor p
Cir_tumor1	<0.001 ***
Mutacion12	0.542
Mutacion12ALA	0.428
Mutacion12ARG	0.995
Mutacion12ASP	0.963
Mutacion12CYS	0.021 *
Mutacion12SER	0.006 **
Mutacion12VAL	0.349
Mutacion13ASP	0.586
ADC MUCINOSO	0.027 *
ANILLO DE SELLO	0.031 *
ADC CONVENCIONAL	0.882
ALTO GRADO	0.003 **
BAJO GRADO	0.479

Tabla 18: Resultados de los pacientes con estudio mutacional de K-Ras. Modelo multivariable de Cox de tiempo de supervivencia.

En este modelo podemos concluir que hay una relación estadísticamente significativa entre pacientes que no se han sometido a la cirugía ($p < 0.001$), la mutación 12Ser ($p = 0.005$) y tumores de alto grado ($p = 0.003$) con una mortalidad aumentada. De igual manera se asocian la mutación 12Cys ($p = 0.02$), los tumores mucinosos ($p = 0.02$) y los tumores con células “en anillo de sello” ($p = 0.03$).

3.- FACTORES PRONÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS

1.- Resultados globales

Una vez recogidos todos los datos a lo largo de los primeros 5 años del estudio, se han obtenido los siguientes resultados (Tablas 19-22), desglosados en los 5 ámbitos descritos anteriormente. Se indican el número de casos totales en cada apartado y entre paréntesis el porcentaje respecto al total.

Respecto a los datos generales (edad, sexo y localización del tumor) y número de recidivas, presencia de metástasis y estado del paciente:

EDAD	68.8 (11.6)		
	MEDIA (DESVIACIÓN ESTANDAR)		
SEXO			
	HOMBRE	143 (68.4%)	
	MUJER	66 (31.6%)	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR			
	RECTO BAJO (0-5 CM)	92 (44.0%)	
	RECTO MEDIO (5-10 CM)	86 (41.1%)	
	RECTO ALTO (>10 CM)	31 (14.8%)	
RECIDIVA			
	NO	201 (96.2%)	
	SI	8 (3.83%)	
	TIEMPO RECIDIVA (MEDIANA)		1097 DÍAS
METÁSTASIS			
	NO	184 (88.0%)	
	SI	25 (12.0%)	
	TIEMPO METÁSTASIS (MEDIANA)		1022 DÍAS
ESTADO DEL PACIENTE			
	VIVO	159 (76.1%)	
	MUERTO	50 (23.9%)	
	TIEMPO SUPERVIVENCIA (MEDIANA)		890 DÍAS

Tabla 19: Resultados del estudio de las piezas quirúrgicas de recto. Datos generales.

Radiología

- ESTADIAJE PREOPERATORIO	
RM si / Eco si	40 (22.48%)
RM si / Eco no	111 (62.40%)
RM no / Eco si	7 (3.88%)
RM no / Eco no	20 (11.24%)
- ESTUDIO DE EXTENSIÓN	
TAC	158 (88,76%)
No TAC	20 (11.24%)
- MEDICIÓN DE DISTANCIA MARGEN RADIAL (RNM)	
DEL TUMOR	127 (70%)
ADENOPATÍA	85 (47%)
INTEGRIDAD DEL APARATO ESFINTERIANO	
<i>LIBRE</i>	148 (81,78%)
<i>AFECTO</i>	14 (7,75%)
<i>NO DATOS</i>	19 (10,47%)
- ESTADIO RADIOLÓGICO	
ESTADIO 0	2 (0.96%)
ESTADIO I	36 (17.2%)
ESTADIO II	36 (17.2%)
ESTADIO III	103 (49.3%)
ESTADIO IV	30 (14.4%)
NO CODIFICADOS	2 (0.96%)
- MARGEN RADIAL AFECTADO	
DEL TUMOR	51 (28%)
ADENOPATÍA	16 (9%)

Tabla 20: Resultados del estudio de las piezas quirúrgicas de recto. Datos radiológicos.

Tratamiento oncológico

NEOADYUVANCIA	114	(54.5%)
<i>ESTADIO III</i>	53	(58.14%)
<i>T4</i>	18	(20.16%)
ADYUVANCIA	115	(63.95%) (*)
<i>ESTADIO I</i>	11	(9.70%)
<i>ESTADIO II</i>	15	(12.73%)
<i>ESTADIO III</i>	59	(51.52%)
<i>ESTADIO IV</i>	24	(21.21%)
<i>NO CONSTA</i>	6	(4,84%)

Tabla 21: Resultados del estudio de las piezas quirúrgicas de recto. Datos oncológicos. (*): Se incluyen 25 casos de tratamiento neoadyuvante que han hecho también adyuvancia post-quirúrgica.

Protocolo quirúrgico

TIPO DE INTERVENCIÓN		
RESECCIÓN LOCAL	8	(3.88%)
RESECCIÓN ANTERIOR DE RECTO	87	(41.6%)
ALTA		
BAJA		
AMPUTACIÓN ABDOMINOPERINEAL	62	(29.7%)
Convencional	54	(26.21%)
Extralevadora	8	(3.88%)
PROCTOCOLECTOMÍA	0	
INTERVENCIÓN DE HARTMANN	34	(16.3%)
ESTOMA DE DERIVACIÓN	16	(7,65%)
EXANTERACIÓN	0	
LAPAROTOMÍA EXPLORADORA	2	(0.97%)
EXÉRESIS DEL MESORRECTO (ETM)		
PARCIAL	34	(16.3%)
TOTAL	149	(71.3%)
NO REALIZADA	26	(12.4%)
ETM EN TUMORES DE TERCIO MEDIO/INFERIOR		
PARCIAL	12	(9.16%)
TOTAL	113	(86.25%)
NO REALIZADA	6	(4.58%)

VIA DE ABORDAJE		
LAPAROSCÓPICA		163 (78.0%)
LAPAROSCÓPICA CONVERTIDA		14 (6.86%)
ABIERTA		30 (14.71%)
TRANSANAL		2 (0.96%)
PERFORACIÓN DEL TUMOR		13 (6.31%)
RESECCIÓN ANTERIOR ALTA		1 (0.49%)
RESECCIÓN ANTERIOR BAJA		
AMPUTACIÓN ABDOMINOPERINEAL		5 (2.43%)
PROCTOCOLECTOMÍA		0
INTERVENCIÓN DE HARTMANN		3 (1.43%)
INTENCIÓN QUIRÚRGICA		
CURATIVA		174 (84.47%)
PALIATIVA		30 (14.56%)
NO CUMPLIMENTADO		5 (2.4%)
ESTOMA DE DERIVACIÓN (*)		
SI		16 (18.56%)
NO		69 (81.44%)
MORTALIDAD QUIRÚRGICA (A LOS 30 DÍAS)		
SI		3 (1.46%)
NO		206 (98.54%)
COMPLICACIONES		
INFECCIÓN HERIDA OPERATORIA		4 (1.94%)
INFECCIÓN PERINÉ (AMPUTACIÓN)		8 (3.88%)
DEHISCENCIA ANASTOMÓTICA		9 (4.37%)
ABSCESO ABDOMINAL		7 (3.40%)
REINTERVENCIONES		13 (6.31%)

Tabla 22: Resultados del estudio de las piezas quirúrgicas de recto. Datos quirúrgicos. (*): En casos de resección anterior de recto.

Estudio de la pieza quirúrgica (Anatomía patológica)

CALIDAD DE RESECCIÓN DEL MESORRECTO		
SATISFACTORIA		139 (66.0%)
PARCIALMENTE SATISFACTORIA		35 (16.3%)
NO SATISFACTORIA		7 (2.87%)
NO PROCEDE		28 (13.39%)
GRADO DE REGRESIÓN TUMORAL		
GR1: Ausencia de carcinoma (remisión completa).		17 (16.34%)

GR2: Algunas células neoplásicas/glándulas residuales aisladas.	33 (31.73%)
GR3: Predominio de fibrosis sobre tumor.	26 (25%)
GR4: Regresión parcial con predominio de tumor sobre fibrosis	25 (24.03%)
GR5: Tumor sin cambios.	3 (2.88%)
MARGEN QUIRÚRGICO	
CIRCUNFERENCIAL	
AFECTO	14 (7.41%)
LIBRE	175 (92.6%)
DISTAL	
LIBRE	181 (89.55%)
TIPO DE RESECCIÓN	
R0	181 (95.3%)
R1	7 (3.68%)
R2	2 (1.05%)
GANGLIOS LINFÁTICOS	
AISLADOS	
RANGO	(1-30)
MEDIA	7.59 (6.19)
AFECTADOS	
RANGO	(0-24)
MEDIA	1.32 (3.05)
TIPO HISTOLÓGICO	
ADENOCARCINOMA CONVENCIONAL	189 (93.6%)
ADENOCARCINOMA MUCINOSO	11 (5.45%)
CARCINOMA MEDULAR	1 (0.5%)
pT	
pT0	29 (14.4%)
pTis	7 (3.47%)
pT1	9 (4.46%)
pT2	41 (20.3%)
pT3	92 (45.5%)
pT4	24 (11.9%)
pN	
pN0	140 (69.3%)
pN1	37 (18.3%)
pN2	25 (12.4%)
pM	
pM0	31 (15.3%)
pM1	171 (84.7%)
ESTADIO	
ESTADIO 0	24 (11.5%)
ESTADIO I	38 (18.2%)
ESTADIO II	54 (25.8%)
ESTADIO III	51 (24.4%)
ESTADIO IV	31 (14.8%)
NO PROCEDE	11 (5.26%)

Tabla 23: Resultados del estudio de las piezas quirúrgicas de recto. Datos histopatológicos.

Seguimiento

RECIDIVA		
	LOCAL	6 (3.10%)
	SISTÉMICA	19 (9.69%)
	LOCAL + SISTÉMICA	26 (13.41%)
ESTADO DEL PACIENTE		
	VIVO	152 (75.58%)
	MUERTO	49 (24.42%)

Tabla 24: Resultados del estudio de las piezas quirúrgicas de recto. Datos de seguimiento.

2.- Resultados estadísticos

2.1.- Recidiva local

Tan sólo se identificaron 8 recidivas en los 209 casos estudiados (3.83%). El análisis estadístico apenas mostró diferencias significativas entre la presencia o ausencia de recidiva local y las diferentes variables clínico-patológicas.

Hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad de los pacientes y la presencia de recidiva local, de manera que los casos con recidivas presentan edades menores ($p=0.021$). También es significativa la diferencia en cuanto al grado de regresión tumoral en los pacientes que han recidivado, de manera que las recidivas son más frecuentes en los tumores que han respondido poco al tratamiento (grados de regresión 3 y 4) con $p=0.025$.

Resultados

	No recidiva N=201	Recidiva N=8	p global
Regresión:			0.025
1	17 (8.76%)	0 (0.00%)	
2	32 (16.5%)	1 (12.5%)	
3	22 (11.3%)	4 (50.0%)	
4	23 (11.9%)	2 (25.0%)	
5	3 (1.55%)	0 (0.00%)	
NI	97 (50.0%)	1 (12.5%)	
Edad	70.7 [60.0;78.2]	55.5 [50.1;70.0]	0.021

Se describe una tendencia entre la presencia de complicaciones y las recidivas (p=0.111). De igual manera, entre estos pacientes y el hecho de haber recibido tratamiento neoadyuvante (p=0.074).

	No recidiva N=201	Recidiva N=8	p global
Complicaciones:			0.111
Si	60 (29.9%)	5 (62.5%)	
No	141 (70.1%)	3 (37.5%)	
Tto Neoadyuvante:			0.074
Si	107 (53.2%)	7 (87.5%)	
No	94 (46.8%)	1 (12.5%)	

Aunque no estadísticamente significativos, destacan los *hazard ratio* (HR) de 4,23 (p=0.26) y 5,15 (p=0.188) respectivamente, para las variables tratamiento neoadyuvante y presencia de perforación. (Tabla 25)

	No event n= 148	Event n= 7	Crude HR	p-value	Multivariate HR	p-value
Age (10y)	6.87 (1.14)	5.99 (1.22)	0.53 [0.27;1.05]	0.069	0.92 [0.40; 2.14]	0.844
Sex: Men	97 (65.5%)	7 (100%)	354175336 [0.00;.]	0.998	22377867.23 [0.00; Inf]	0.997
Tumor level:						
0-6cm	61 (41.2%)	4 (57.1%)	0.91 [0.17;4.96]	0.912	0.00 [0.00; Inf]	0.999
7-11cm	65 (43.9%)	1 (14.3%)	0.20 [0.02;2.22]	0.191	0.34 [0.02; 6.82]	0.482
Tumor stage:						
0	19 (12.8%)	0 (0.00%)	1.00 [0.00;.]	1.000	1.20 [0.00; Inf]	1
II	47 (31.8%)	4 (57.1%)	425690876 [0.00;.]	0.999	68244790.53 [0.00; Inf]	0.998
III	48 (32.4%)	3 (42.9%)	308087206 [0.00;.]	0.999	48753296.30 [0.00; Inf]	0.998
Neoadjuvant treatment	83 (56.1%)	6 (85.7%)	4.37 [0.53;36.3]	0.172	4.23 [0.34;52.05]	0.26
Type of resection:						
Abdominoperineal resection	46 (31.1%)	4 (57.1%)	3.63 [0.66;19.8]	0.137	30940963.73 [0.00; Inf]	0.998
Hartmann	28 (18.9%)	1 (14.3%)	1.32 [0.12;14.7]	0.822	1.04 [0.06;18.70]	0.976
Perforation	8 (5.41%)	2 (28.6%)	8.84 [1.70;45.9]	0.010	5.15 [0.45;59.06]	0.188
Invasion circumferential margin	11 (7.43%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.999	0.00 [0.00; Inf]	0.999
Mesorecto quality:						
Partial	29 (19.9%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.999	0.00 [0.00; Inf]	0.998
No-satisfactory	4 (2.74%)	2 (28.6%)	9.93 [1.92;51.4]	0.006	1.65 [0.12;22.77]	0.707

Reference categories:

- Age, a decade
- Sex, Women
- Tumor level, 12-15cm
- Tumor stage: 1
- Neoadjuvant treatment, No
- Type of resection, Anterior resection
- Perforation, No
- Invasion circumferential margin, No
- Mesorecto Quality, Satisfactory

Tabla 25: Resumen de los resultados estadísticos comparando la recidiva local con las diferentes variables.

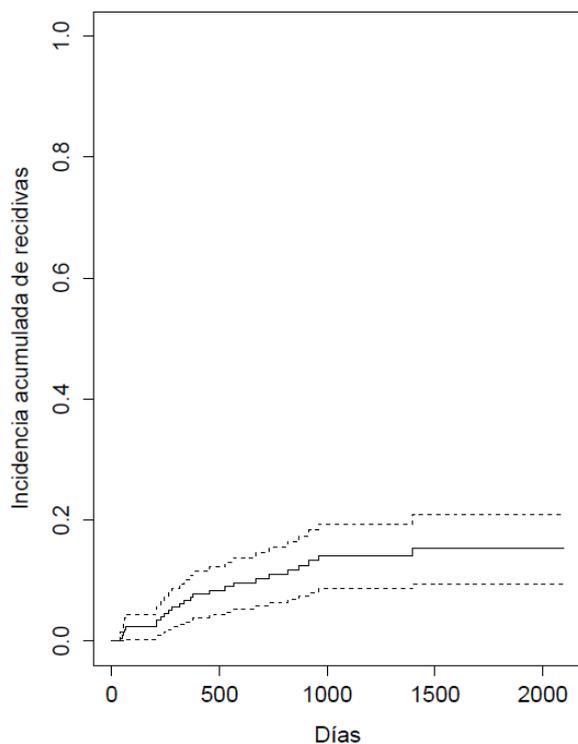


Figura 25: Gráfica de la incidencia acumulada de casos de recidiva local.

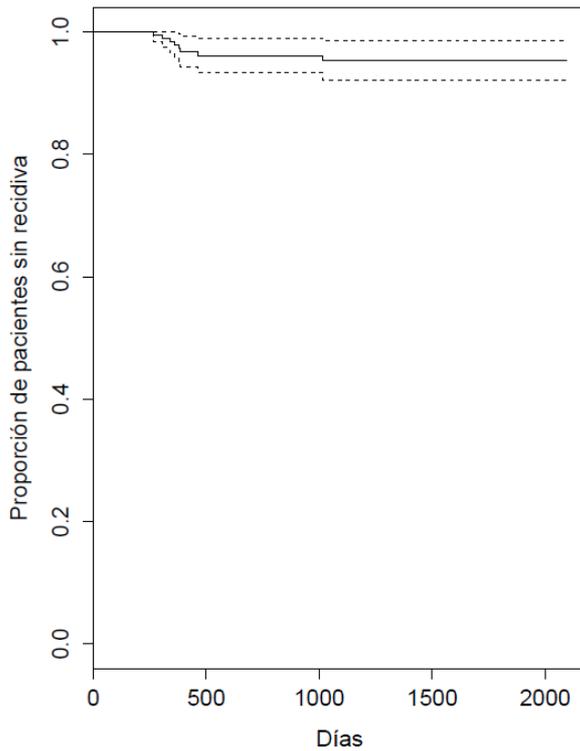


Figura 26: Curvas del tiempo de recidiva local

2.2.- Metástasis

De los 209 casos estudiados 25 presentaron metástasis durante el seguimiento (12.0%).

El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o ausencia de metástasis y el estadio radiológico avanzado (estadio III) con $p=0.002$, así como con el estadio patológico avanzado (estadio III) con $p=0.023$. En cuanto a la localización, se constata una asociación entre la presencia de metástasis y la localización del tumor en tercio medio e inferior del recto ($p=0.067$).

	No metástasis N=184	Metástasis N=25	p global
Estadio Radiológico:			0.002
I	36 (19.6%)	0 (0.00%)	
II	32 (17.4%)	4 (16.0%)	
III	82 (44.6%)	21 (84.0%)	
IV	30 (16.3%)	0 (0.00%)	
NI	2 (1.09%)	0 (0.00%)	
0	2 (1.09%)	0 (0.00%)	
Estadio Patológico:			0.023
I	33 (17.9%)	5 (20.0%)	
II	49 (26.6%)	5 (20.0%)	
III	39 (21.2%)	12 (48.0%)	
IV	31 (16.8%)	0 (0.00%)	
NI	11 (5.98%)	0 (0.00%)	
0	21 (11.4%)	3 (12.0%)	
Localización:			0.067
Recto bajo	85 (46.2%)	7 (28.0%)	
Recto medio	70 (38.0%)	16 (64.0%)	
Recto alto	29 (15.8%)	2 (8.00%)	

El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o ausencia de metástasis y la calidad de resección del mesorrecto, de manera que el riesgo de metástasis aumenta significativamente en aquellos tumores que presentan una escisión del mesorrecto parcial o poco satisfactoria, con un HR DE 3.15 (grado de significación $p=0.039$). Asimismo, se ha estimado un HR de 4.15 ($p=0.081$) para la presencia de metástasis en los tumores localizados en tercio medio del recto (7-11 cm) respecto a los tumores en tercio superior (12-15 cm) (Tabla 26).

Resultados

	No event n= 130	Event n= 25	Crude HR	p-value	Multivariate HR	p-value	N
Age (10y)	6.86 (1.13)	6.70 (1.29)	0.93 [0.66;1.29]	0.654	1.04 [0.71; 1.51]	0.848	155
Sex: Men	85 (65.4%)	19 (76.0%)	1.67 [0.67;4.18]	0.275	1.92 [0.70; 5.26]	0.205	155
Tumor level:							155
0-6cm	58 (44.6%)	7 (28.0%)	1.55 [0.32;7.46]	0.585	1.16 [0.11;12.14]	0.898	
7-11cm	50 (38.5%)	16 (64.0%)	3.60 [0.83;15.7]	0.088	4.15 [0.84;20.47]	0.081	
Tumor stage:							155
0	16 (12.3%)	3 (12.0%)	1.08 [0.26;4.51]	0.921	0.87 [0.19; 4.03]	0.864	
II	46 (35.4%)	5 (20.0%)	0.58 [0.17;2.00]	0.386	0.39 [0.09; 1.68]	0.207	
III	39 (30.0%)	12 (48.0%)	1.49 [0.52;4.23]	0.456	2.09 [0.68; 6.41]	0.199	
Neoadjuvant treatment	71 (54.6%)	18 (72.0%)	1.87 [0.78;4.47]	0.161	1.73 [0.62; 4.86]	0.296	155
Type of resection:							155
Abdominoperineal resection	44 (33.8%)	6 (24.0%)	0.73 [0.28;1.90]	0.517	1.78 [0.25;12.92]	0.568	
Hartmann	24 (18.5%)	5 (20.0%)	0.95 [0.34;2.64]	0.918	1.50 [0.43; 5.27]	0.53	
Perforation	8 (6.15%)	2 (8.00%)	1.57 [0.37;6.67]	0.540	1.32 [0.26; 6.65]	0.736	155
Invasion circumferential margin	10 (7.69%)	1 (4.00%)	0.54 [0.07;4.03]	0.552	0.54 [0.06; 4.43]	0.563	155
Mesorecto quality:							153
Partial	23 (17.8%)	6 (25.0%)	1.76 [0.69;4.47]	0.235	3.15 [1.06; 9.35]	0.039	
No-satisfactory	5 (3.88%)	1 (4.17%)	1.04 [0.14;7.85]	0.966	2.65 [0.25;27.67]	0.415	

Reference categories:

- Age, a decade
- Sex, Women
- Tumor level, 12-15cm
- Tumor stage: 1
- Neoadjuvant treatment, No
- Type of resection, Anterior resection
- Perforation, No
- Invasion circumferential margin, No
- Mesorecto Quality, Satisfactory

Tabla 26: Resumen de los resultados estadísticos comparando la presencia de metástasis con las diferentes variables.

	No metástasis N=184	Metástasis N=25	HR	p global
Estadio Radiológico:				0.009
I	36 (19.6%)	0 (0.00%)	Ref.	
II	32 (17.4%)	4 (16.0%)	249249236 [0.00; .]	
III	82 (44.6%)	21 (84.0%)	430047795 [0.00; .]	
IV	30 (16.3%)	0 (0.00%)	1.00 [0.00; .]	
NI	2 (1.09%)	0 (0.00%)	1.00 [0.00; .]	
O	2 (1.09%)	0 (0.00%)	1.01 [0.00; .]	
Estadio Patológico:				0.042
I	33 (17.9%)	5 (20.0%)	Ref.	
II	49 (26.6%)	5 (20.0%)	0.58 [0.17; 2.02]	
III	39 (21.2%)	12 (48.0%)	1.51 [0.53; 4.30]	
IV	31 (16.8%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00; .]	
NI	11 (5.98%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00; .]	
O	21 (11.4%)	3 (12.0%)	0.86 [0.20; 3.59]	
Localización:				0.018
Recto bajo	85 (46.2%)	7 (28.0%)	Ref.	
Recto medio	70 (38.0%)	16 (64.0%)	2.95 [1.21; 7.17]	
Recto alto	29 (15.8%)	2 (8.00%)	0.85 [0.18; 4.09]	

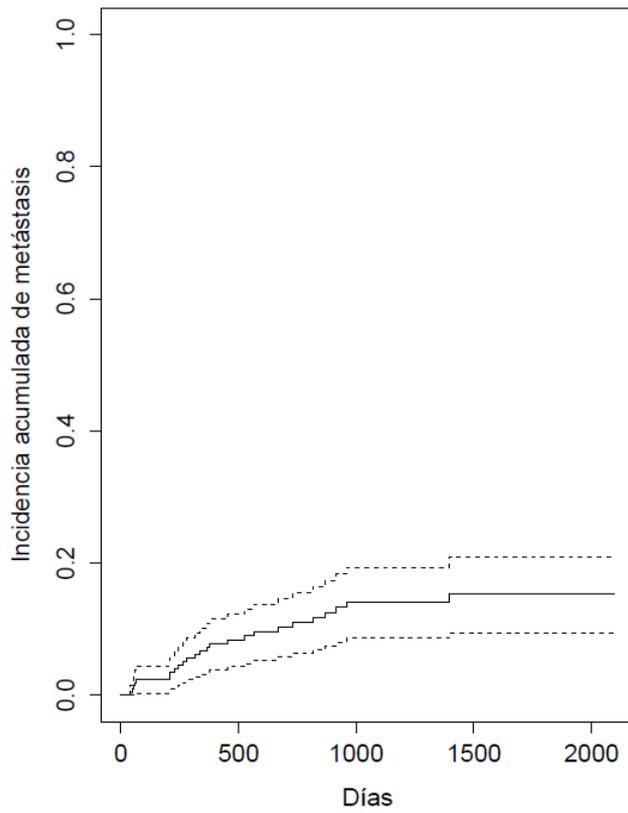


Figura 27: Gráfica de la incidencia acumulada de casos de metástasis.

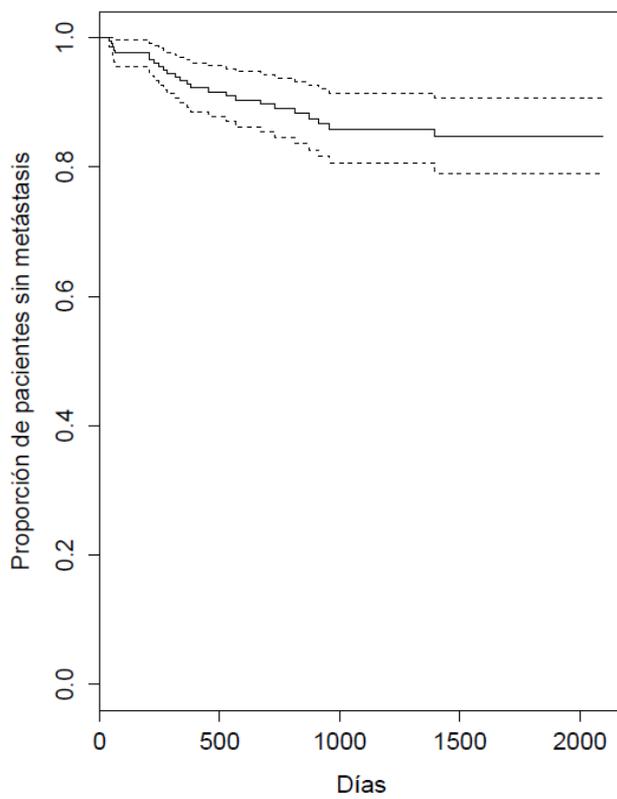


Figura 28: Curvas del tiempo de aparición de metástasis

2.3.- Supervivencia

Al finalizar el estudio 50 pacientes habían fallecido (23.9%), 3 de ellos en el mes posterior a la cirugía.

Se observaron varias asociaciones significativas entre la supervivencia y diferentes variables clínico-patológicas. El análisis estadístico mostró un aumento del riesgo de muerte, estadísticamente significativo, en pacientes de sexo masculino (HR=4.5, $p=0.024$), así como tendencias estadísticas con la localización del tumor y la técnica quirúrgica. De esta manera, se ha estimado un HR de 7.34 ($p=0.066$) para riesgo de muerte en los tumores localizados en tercio medio (7-11 cm) respecto a los tumores en tercio superior (12-15 cm). De igual forma, se ha estimado un HR de 5.11 ($p=0.064$) para el riesgo de exitus en los pacientes sometidos a amputación abdominoperineal respecto a las intervenciones de resección anterior (Tabla 25), así como un HR de 9.23 ($p<0.001$) de riesgo de exitus en los pacientes en los que sólo se puede realizar estoma de derivación y/o laparotomía exploradora, es decir, en tumores no resecables, respecto a los pacientes sometidos a resección anterior. Por otra parte, también se constatan diferencias significativas según el estadio patológico, de manera que el riesgo de producirse la muerte aumenta con la estadificación del tumor. Así, tumores en Estadío IV tienen un HR de 4.39 ($p=0.010$) respecto a pacientes con Estadío I. Lo mismo ocurre en cuanto al estadio radiológico ($p=0.011$). En cuanto al grado de infiltración del tumor, tumores poco infiltrantes (T2) tienen menos posibilidades de éxitus (HR: 0.42; $p=0.076$). Lógicamente, estas diferencias se constatan también con el número de ganglios afectados, en el que la media de ganglios afectados en pacientes que han fallecido es de 2.18 mientras que en pacientes vivos es de 1.04

($p=0.024$). De igual manera, la presencia de metástasis en el momento del estudio histológico empobrece el pronóstico ($p=0.007$).

También se han constatado diferencias respecto a la presencia de complicaciones, de manera que los pacientes que no presentan complicaciones tienen menos posibilidades de fallecer con un HR igual a 0.57 ($p=0.051$). De igual manera es interesante constatar la relación entre la exéresis del mesorrecto y la supervivencia: las posibilidades de éxitus aumentan en aquéllos en los que no se ha podido realizar la exéresis completa del mesorrecto (HR: 8.51; $p=0.001$). La presencia o no de tumor residual (clasificación R) también está relacionada con la supervivencia ($p<0.001$). Tumores residuales macroscópicos (R2) aumentan considerablemente las posibilidades de éxitus respecto a los R0 (HR=12.6; $p=0.001$).

Resultados

	Vivos N=159	Muertos N=50	HR	p.ratio	p global
Estadio Radiológico:					0.011
I	31 (19.5%)	5 (10.0%)	Ref.	Ref.	
II	29 (18.2%)	7 (14.0%)	1.44 [0.46;4.54]	0.533	
III	80 (50.3%)	23 (46.0%)	1.56 [0.59;4.10]	0.369	
IV	16 (10.1%)	14 (28.0%)	4.10 [1.48;11.4]	0.007	
NI	1 (0.63%)	1 (2.00%)	6.31 [0.73;54.6]	0.094	
O	2 (1.26%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.997	
Exeresis Mesorrecto:					0.001
Parcial	31 (19.5%)	3 (6.00%)	Ref.	Ref.	
Total	112 (70.4%)	37 (74.0%)	3.13 [0.97;10.2]	0.057	
No realizada	16 (10.1%)	10 (20.0%)	8.51 [2.33;31.1]	0.001	
Complicaciones:					0.048
Sí	43 (27.0%)	22 (44.0%)	Ref.	Ref.	
No	116 (73.0%)	28 (56.0%)	0.57 [0.33;1.00]	0.051	
pT:					0.117
pT0	18 (11.7%)	11 (22.9%)	Ref.	Ref.	
pTis	7 (4.55%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.997	
pT1	9 (5.84%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.996	
pT2	34 (22.1%)	7 (14.6%)	0.42 [0.16;1.09]	0.076	
pT3	70 (45.5%)	22 (45.8%)	0.62 [0.30;1.28]	0.194	
pT4	16 (10.4%)	8 (16.7%)	1.07 [0.43;2.67]	0.884	
pN:					0.304
pN0	93 (60.4%)	28 (58.3%)	Ref.	Ref.	
NA	16 (10.4%)	3 (6.25%)	0.64 [0.19;2.10]	0.460	
pN1	30 (19.5%)	7 (14.6%)	0.81 [0.35;1.86]	0.621	
pN2	15 (9.74%)	10 (20.8%)	1.69 [0.82;3.47]	0.156	
pM:					0.007
pM1	18 (11.7%)	13 (27.1%)	Ref.	Ref.	
pM0	136 (88.3%)	35 (72.9%)	0.43 [0.23;0.81]	0.009	
GangliosAis	6.00 [4.00;11.5]	5.00 [2.00;10.8]	0.97 [0.92;1.02]	0.260	0.260
GangliosAfec	0.00 [0.00;1.00]	0.00 [0.00;2.00]	1.08 [1.01;1.16]	0.024	0.024
Tipo Resección					<0.001
R0	145 (96.7%)	36 (90.0%)	Ref.	Ref.	
R1	5 (3.33%)	2 (5.00%)	1.65 [0.40;6.84]	0.493	
R2	0 (0.00%)	2 (5.00%)	12.6 [2.86;55.8]	0.001	
Calidad meso:					0.002
Completa	111 (69.8%)	27 (54.0%)	Ref.	Ref.	
Casi completa	25 (15.7%)	9 (18.0%)	1.36 [0.64;2.90]	0.420	
Incompleta	4 (2.52%)	2 (4.00%)	1.49 [0.36;6.28]	0.584	
NI	19 (11.9%)	12 (24.0%)	3.54 [1.78;7.05]	<0.001	
Estadio Patológico:					<0.001
I	34 (21.4%)	4 (8.00%)	Ref.	Ref.	
II	43 (27.0%)	11 (22.0%)	1.87 [0.60;5.87]	0.284	
III	38 (23.9%)	13 (26.0%)	2.24 [0.73;6.87]	0.159	
IV	18 (11.3%)	13 (26.0%)	4.39 [1.43;13.5]	0.010	
NI	5 (3.14%)	6 (12.0%)	13.4 [3.72;47.9]	<0.001	
O	21 (13.2%)	3 (6.00%)	1.10 [0.25;4.94]	0.897	
Técnica Qx:					<0.001
Resección anterior	76 (47.8%)	11 (22.0%)	Ref.	Ref.	
Resección local	8 (5.03%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.996	
Amputación	42 (26.4%)	20 (40.0%)	2.78 [1.33;5.80]	0.007	
Estoma	8 (5.03%)	10 (20.0%)	9.23 [3.88;22.0]	<0.001	
Hartmann	25 (15.7%)	9 (18.0%)	2.07 [0.86;4.99]	0.107	
Otros	1 (0.65%)	0 (0.00%)	0.00 [0.00;.]	0.997	
Localización:					0.209
Recto bajo	64 (40.3%)	28 (56.0%)	Ref.	Ref.	
Recto medio	69 (43.4%)	17 (34.0%)	0.68 [0.37;1.23]	0.202	
Recto alto	26 (16.4%)	5 (10.0%)	0.49 [0.19;1.27]	0.143	

	No event n= 127	Event n= 28	Crude		Multivariate		N
			HR	p-value	HR	p-value	
Age (10y)	6.77 (1.15)	7.10 (1.18)	1.24 [0.89;1.72]	0.204	1.23 [0.84; 1.82]	0.286	155
Sex: Men	79 (62.2%)	25 (89.3%)	4.27 [1.29;14.2]	0.017	4.35 [1.22;15.55]	0.024	155
Tumor level:							155
0-6cm	50 (39.4%)	15 (53.6%)	6.31 [0.83;47.8]	0.074	2.30 [0.15;34.33]	0.546	
7-11cm	54 (42.5%)	12 (42.9%)	5.02 [0.65;38.6]	0.121	7.34 [0.87;61.54]	0.066	
Tumor stage:							155
0	16 (12.6%)	3 (10.7%)	1.69 [0.34;8.37]	0.522	1.40 [0.28; 7.16]	0.683	
II	42 (33.1%)	9 (32.1%)	1.81 [0.49;6.69]	0.374	1.02 [0.24; 4.27]	0.977	
III	38 (29.9%)	13 (46.4%)	2.67 [0.76;9.37]	0.126	2.66 [0.72; 9.82]	0.143	
Neoadjuvant treatment	70 (55.1%)	19 (67.9%)	1.42 [0.64;3.15]	0.383	1.41 [0.56; 3.50]	0.465	155
Type of resection:							155
Abdominoperineal resection	35 (27.6%)	15 (53.6%)	2.64 [1.18;5.88]	0.018	5.11 [0.91;28.83]	0.064	
Hartmann	26 (20.5%)	3 (10.7%)	0.87 [0.24;3.17]	0.832	1.14 [0.27; 4.85]	0.862	
Perforation	7 (5.51%)	3 (10.7%)	2.30 [0.69;7.63]	0.173	2.66 [0.54;13.12]	0.229	155
Invasion circumferential margin	9 (7.09%)	2 (7.14%)	1.07 [0.25;4.53]	0.922	0.41 [0.06; 2.88]	0.373	155
Mesorrecto quality:							153
Partial	21 (16.8%)	8 (28.6%)	1.79 [0.78;4.09]	0.169	1.34 [0.49; 3.66]	0.571	
No-satisfactory	5 (4.00%)	1 (3.57%)	0.95 [0.13;7.08]	0.958	0.66 [0.06; 7.29]	0.734	

Reference categories:

- Age, a decade
- Sex, Women
- Tumor level, 12-15cm
- Tumor stage: 1
- Neoadjuvant treatment, No
- Type of resection, Anterior resection
- Perforation, No
- Invasion circumferential margin, No
- Mesorrecto Quality, Satisfactory

Tabla 27: Resumen de los resultados estadísticos comparando la presencia de exitus con las diferentes variables.

Resultados

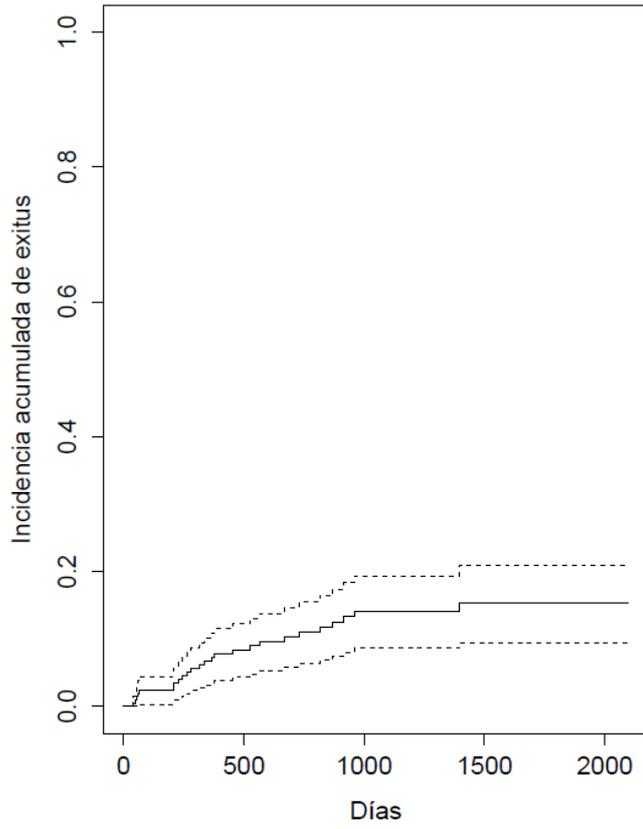


Figura 29: Gráfica de la incidencia acumulada de casos de metástasis.

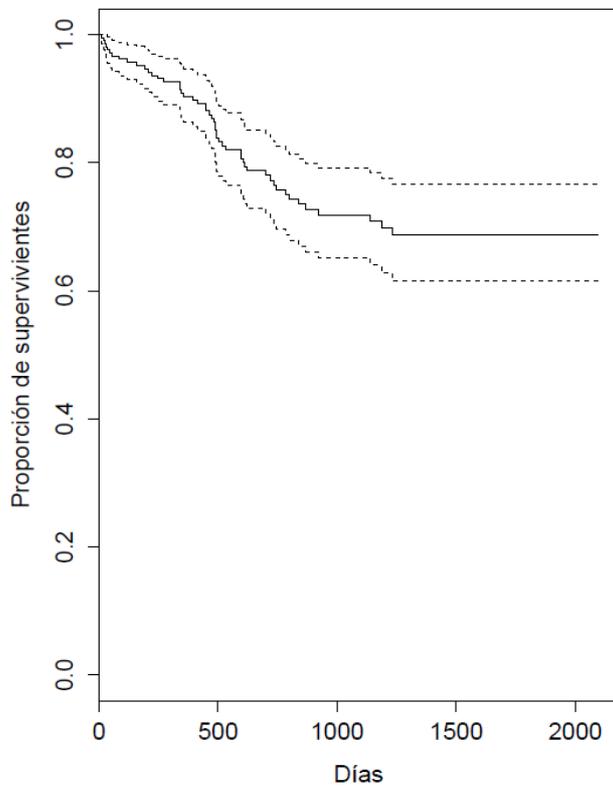


Figura 30: Estimación de Kaplan-Meier de la probabilidad de supervivencia acumulada.

En el estudio de la presencia de recidiva local, metástasis y exitus, comparándolos con los diferentes tipos de resección quirúrgica entre sí se obtuvieron las siguientes curvas de incidencia acumulada, sin observar diferencias significativas en cuanto a recidiva local (figura 31) o metástasis (figura 32). En cambio sí que se observa una diferencia significativa en cuanto a supervivencia si comparamos resección anterior con amputación abdominoperineal con un valor $p=0.020$ (figura 33).

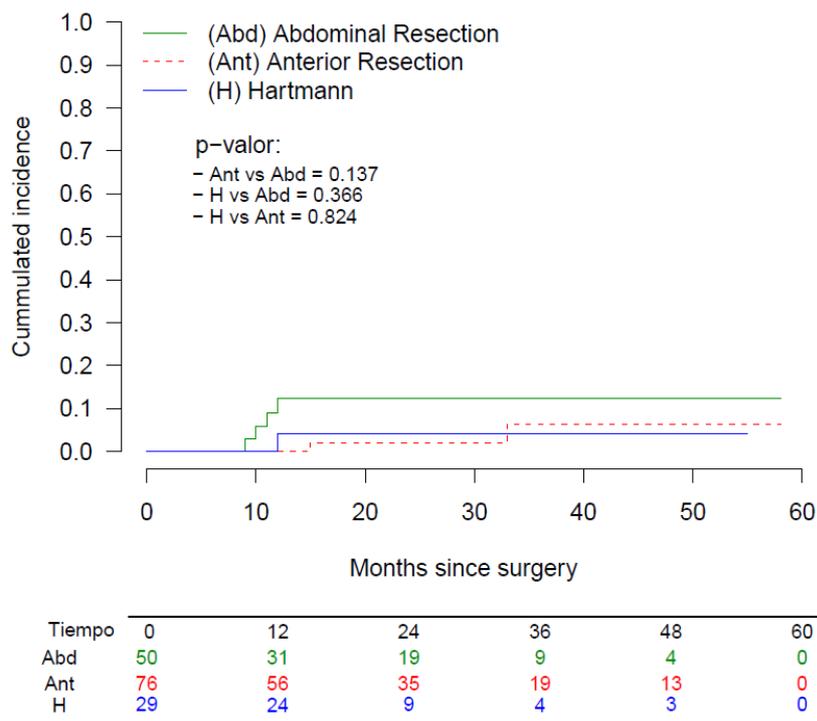


Figura 31: Curva de incidencia acumulada de recidiva local según el tipo de cirugía practicada.

Resultados

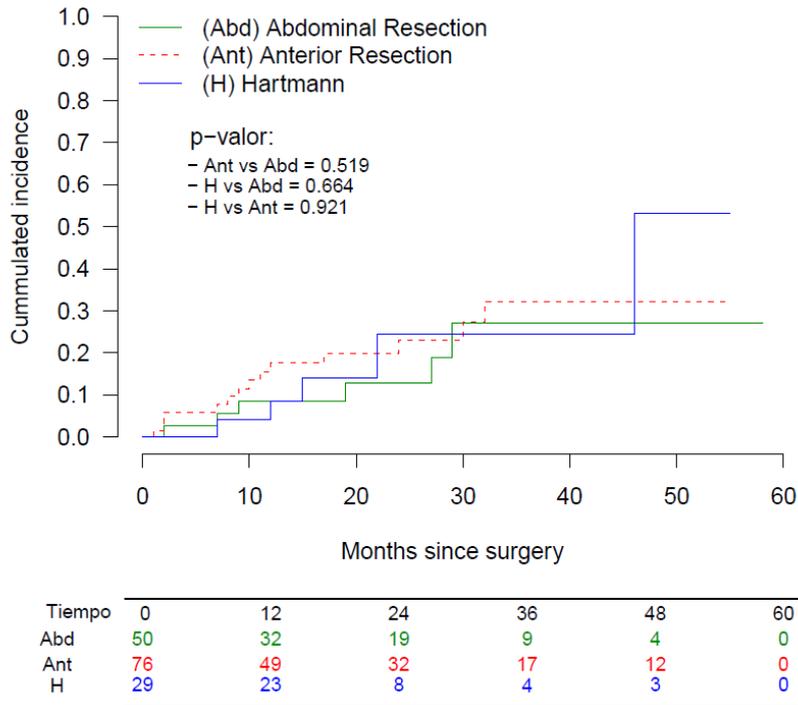


Figura 32: Curva de incidencia acumulada de metástasis según el tipo de cirugía practicada.

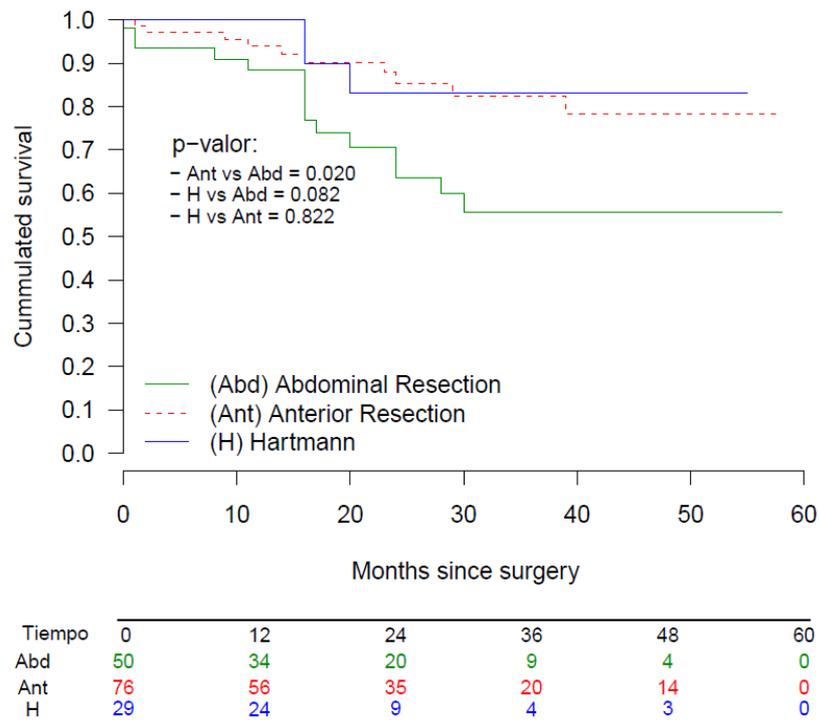


Figura 33: Estimación de Kaplan-Meier de la probabilidad de supervivencia acumulada en relación con el tipo de cirugía practicada.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1.- OSNA Y GANGLIO CENTINELA

Estamos ante un estudio europeo prospectivo y multicéntrico, en el que hemos obtenido un índice de supraestadificación de 25.2% en un grupo de pacientes inicialmente catalogados como pN0 a través de estudio histopatológico convencional con HE. En el estudio convencional se analiza un corte medio del volumen del ganglio, con lo que podría haber depósitos tumorales fuera de este corte que quedarían sin estudiar. El estudio molecular a través de OSNA proporciona una técnica estandarizada que permite el análisis completo del ganglio linfático en su totalidad, con lo que se evita dicho sesgo de muestreo. Por esta razón, esta técnica proporcionaría una estadificación pN mucho más precisa.

La recidiva tumoral en cáncer de colon en estadio II UICC asciende hasta un 20% después de tratamiento quirúrgico con obtención de pieza de resección que incluye la escisión completa del tumor. A partir de este preocupante dato se ha establecido un debate sobre si los pacientes con estadio II deberían o no recibir quimioterapia adyuvante. Algunos estudios han identificado factores moleculares pronósticos que podrían seleccionar pacientes de alto riesgo que serían candidatos a tratamiento adyuvante. (Croner et al, 2008; Gray et al, 2011; Kennedy et al, 2011; Salazar et al, 2011; Nitsche et al, 2012; Maak et al, 2013). Pero hasta ahora ninguno de estos paneles de marcadores se ha aplicado a la rutina clínica.

Recientemente se ha descrito el valor pronóstico de las células tumorales aisladas y las micrometástasis en los ganglios linfáticos de cáncer colorrectal en estadios I y II. En los estudios histopatológicos de rutina, en los cortes de H/E de los ganglios linfáticos, como ya se ha comentado,

puede que haya metástasis subyacentes ocultas por debajo de las áreas seccionadas y no se identifiquen microscópicamente, razón por la cual dichos pacientes quedarían infraestadificados como pN0. Por esta razón es del máximo interés diseñar métodos que permitan el estudio completo del ganglio linfático en un tiempo y forma adecuados. OSNA es un método biotecnológico diseñado para identificar mRNA de CK19 con el fin de detectar metástasis ganglionares en cáncer de mama y colorrectal (Tsujimoto et al, 2007; Croner et al, 2010; Yamamoto et al, 2011, 2013; Guller et al, 2012). La enorme ventaja de este método consiste en que el ganglio linfático completo puede ser homogeneizado y transferido a OSNA sin preparación especial previa, reduciéndose así el riesgo potencial de contaminación.

El procedimiento ya se ha estandarizado y tras una asimilable curva de aprendizaje es fácilmente incorporable para el uso clínico. Además, los resultados se obtienen en 20 minutos si se trata de un solo ganglio linfático o en 30-40 minutos en caso de 3-4 ganglios, cosa que hace que este método sea aún más fácilmente aplicable a la rutina clínica. Las secciones seriadas de todo el ganglio completo con el consiguiente estudio histológico y/o inmunohistoquímico representarían una enorme inversión de tiempo y esfuerzo y no sería aplicable de forma rutinaria. Por ello OSNA es mucho más apropiado en los estudios clínicos de rutina. Hemos encontrado que el índice de supraestadificación se correlaciona con el número de ganglios linfáticos analizados y con el estadio tumoral. Llama la atención en nuestro estudio la presencia de un índice de supraestadificación para pacientes en estadio I y II de 16.2% y 30.3% respectivamente. El índice global de supraestadificación es de 25.2%, cosa que concuerda con los índices de recurrencia publicados para estadios I y II. Por ello, se confirmaría la hipótesis de que los pacientes diagnosticados previamente en estadios I y II que han desarrollado recidivas podrían haberse infraestadificado

mediante análisis convencional H/E, perteneciendo en realidad a un estadio III. Para asegurarnos de que no identificamos micrometástasis ni células tumorales aisladas, conceptos que están todavía bajo discusión en cuanto a su valor pronóstico, definimos un número de copias de RNAm de CK19 superior a 5000 como único valor positivo (Guller et al, 2012; Mescoli et al, 2012; Rahbari et al, 2012). Este umbral se definió en estudios previos de viabilidad donde los ganglios con células tumorales aisladas fueron negativos para OSNA en el 95% de los casos si utilizamos este valor como *cutoff* (Guller et al, 2012). Aunque los ganglios se incluyen en su totalidad en el procedimiento histológico, en la mayoría de los centros se realiza un único corte de H/E en la parte media de cara al estudio histopatológico. Por esta razón podrían quedar sin estudiar depósitos tumorales a ambos lados de dicha sección, en la profundidad del bloque de parafina, dando lugar a un sesgo de estadificación. Con el fin de probar que la supraestadificación mediante OSNA de pacientes con ganglios negativos se asocia con un índice mayor de recidivas, hacemos el seguimiento de los pacientes de nuestro estudio a lo largo de 5 años con estudios de supervivencia después de 3 y 5 años. Hasta el momento, los 3 pacientes con positividad para OSNA están vivos y no han presentado recidivas, si bien no se han completado los 5 años (60 meses de seguimiento) estando en 45, 42 y 27 meses. Uno de los posibles sesgos para el estudio de la supervivencia es el hecho de que en algunos de los pacientes con OSNA positivo (y en nuestra serie en 2 de los 3 casos) se les ha aplicado igualmente tratamiento adyuvante aunque se encontraban en Estadio II. La razón principal es la presencia de infiltración de la serosa (pT4a) o bien por presentar factores de mal pronóstico (invasión angiolímfática), independientemente de que los ganglios sean negativos. En el resto de los pacientes del estudio con supraestadificación, hasta el momento no se han diagnosticado recidivas, siendo la supervivencia del 100%.

El grupo de pacientes con pT3 fue no solo el grupo más numeroso (56.3%) entre los pacientes pN0 sino que parece que tienen el mayor potencial de supraestadificación. Esto concuerda con el hecho de que en los grupos pT1/pT2 (con un pronóstico más favorable) se espera que haya un índice menor de metástasis ganglionares. Además, es evidente que la progresión de las células tumorales metastásicas no sigue un drenaje linfático linear, aunque es más frecuente en ganglios linfáticos estrechamente relacionados con el tumor primario. El papel que juegan las citocinas o quimiocinas relacionadas con el tumor en los ganglios linfáticos y sus consecuencias para la siembra de las células malignas, permanece como objeto de debate (Langheinrich et al, 2012).

Aunque no hemos conseguido establecer una correlación estadísticamente significativa entre parámetros histopatológicos y la positividad de OSNA, probablemente debido al número relativamente pequeño de casos estudiados, sí que hemos constatado algunas tendencias. Por ejemplo, 46 de 77 pacientes (59%) en la cohorte OSNA (-) correspondían a tumores T3 o T4, mientras que este porcentaje fue superior en la categoría OSNA (+) (20/26 pacientes, 77%). De forma similar, respecto a la invasión perineural hemos encontrado presencia de la misma en 7 de 60 casos OSNA (-) (12%) mientras que en casos OSNA (+) está presente en 4 de 18 casos (22%). Esto hallazgos indican una relación entre el tamaño y progresión tumoral y la positividad por OSNA.

Como contrapartida, también se han descrito inconvenientes respecto al método OSNA, como es el hecho de que en el tejido ganglionar homogeneizado, situaciones como son la infiltración por cualquier otro tumor diferente al estudiado u otro tipo de cambios importantes como son diferenciaciones de tipo sarcomatoide en carcinomas, podrían no ser detectados dando lugar a falsos negativos. Sin embargo, estos fenómenos son muy poco frecuentes. Por otra parte, para el estudio de OSNA es

necesario material congelado o no fijado en formol, para lo cual es necesario tener una cierta experiencia en la disección de ganglios mesentéricos en la pieza quirúrgica en fresco (Guller et al, 2012). Sin embargo, dado el potencial efecto beneficioso en la precisión del estadiaje de cáncer de colon mediante OSNA, podemos subestimar estas deficiencias.

Así pues, el presente estudio multicéntrico confirma la hipótesis de supraestadificación en la cuarta parte de pacientes con cáncer de colon previamente diagnosticados como pN0 en el examen histológico de rutina. Estos hallazgos confirman la viabilidad de la técnica de OSNA para el estadiaje ganglionar en pacientes con cáncer de colon (Croner et al, 2010; Yamamoto et al, 2013; Guller et al, 2012). OSNA sería la técnica más precisa para estatificar dichos pacientes e identificar individuos pN0 candidatos a beneficiarse del tratamiento adyuvante. Como siguiente paso, nos hemos planteado un ensayo randomizado controlado, distribuyendo los pacientes en un grupo OSNA (sin estudio con H&E) versus estudio patológico H&E para confirmar OSNA como método de estadificación de rutina en la práctica clínica.

En cuanto al estudio del ganglio centinela, recientemente se han publicado estudios sobre el valor diagnóstico de OSNA en GC de pacientes con cáncer colon (Vogelaar et al, 2014) en el que OSNA se ha presentado como una prometedora herramienta para la detección de metástasis en ganglios centinelas, comparándola con el protocolo convencional de estudio de ganglios linfáticos. Nuestro estudio presenta resultados muy similares. La técnica de mapeo de ganglio centinela “ex vivo” ha presentado una especificidad y unos valores predictivos muy satisfactorios en nuestra serie. De esta manera constatamos que es una herramienta que puede ser valiosa en el futuro de cara a localizar los GC y detectar posibles metástasis que no se pueden detectar por las técnicas de rutina, ya que el GC es el ganglio

con mayor potencial de presentar metástasis a causa de su estrecha proximidad con el tumor. En este sentido, el mapeo “ex vivo” puede ser una técnica sencilla y fiable para obtener una estadificación más precisa en pacientes con cáncer de colon. En estudios publicados previamente el mapeo “ex vivo” ha presentado una sensibilidad del 90-100% y un valor predictivo negativo del 80-100%, con unos índices de supraestadificación que oscilan entre 19 y 57% (Cahill et al, 2008; Lips et al, 2011). En nuestro estudio, aunque la sensibilidad es más baja que en las otras series (66.6%), el valor predictivo negativo es muy alto (95%). De aquí que podemos constatar que la técnica OSNA, en combinación con la detección “ex vivo” del GC aumentaría la detección de ganglios linfáticos positivos siendo muy prometedora en cuanto a la estadificación de estos tumores.

Se han propuesto otros tipos de técnicas para mejorar la precisión en el estadiaje de cáncer colo-rectal. Una de ellas es el examen patológico fino a múltiples niveles del ganglio linfático (Vogelaar et al, 2014), en el que se realizan múltiples secciones del mismo y aplicando en ellas técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-CK19. Esta técnica puede utilizarse también en combinación con OSNA. Aunque los resultados son buenos para detectar micrometástasis (especialmente si es combinada), tiene sus limitaciones, ya que no evita el sesgo de selección de material: las células tumorales podrían estar representadas únicamente en el material reservado para OSNA o en el de las secciones de IHQ. Por otra parte es una técnica que implica invertir mucho tiempo en valorar las múltiples secciones, cosa que no pasa utilizando OSNA, ya que en 40 minutos se pueden analizar 4 ganglios linfáticos enteros. De todas maneras sí que el estudio a múltiples niveles es útil para detectar células tumorales aisladas, aunque el valor clínica de éstas todavía no está definido y se encuentra en debate.

Como inconvenientes de la aplicación de OSNA se ha constatado que sólo es aplicable en material en fresco o congelado con lo que se requiere la presencia inmediata de un patólogo para disecar los GC, siendo esencial la experiencia del mismo en la realización de dicho mapeo. Aunque la realización del mapeo “ex vivo” consume mucho tiempo (50-60 minutos en nuestra experiencia), esto se compensa con la rapidez del análisis de OSNA.

2.- ESTUDIO DEL GEN K-Ras

En nuestro estudio, los tumores de colon que presentaban mutación para K-Ras fueron un 42% del total, una cifra algo superior a la descrita en la literatura (32-40 %) pero que puede explicarse por el sesgo que conlleva estudiar exclusivamente tumores metastáticos. Como se ha comentado más arriba, la inmensa mayoría de las mutaciones Ras están presentes en los codones 12 y 13 de K-Ras, y en nuestra serie el 90.36 % de las mutaciones están en el codón 12 y un 9.63 % se encuentran en el codón 13, proporciones similares a las descritas en las publicaciones (Watanabe et al, 2013). Sin embargo, la mutación 12Val no es la más frecuente en nuestros pacientes, como tradicionalmente se ha descrito. En orden decreciente, las mutaciones más frecuentes han sido 12Asp (38.55%), 12Val (27.71%) y 12Cys (14.45%), resultados que coinciden con los publicados por Imamura (Imamura et al, 2012) y, más recientemente, con la serie de Kodaz (Kodaz et al, 2015).

Los resultados obtenidos en cuanto a tipo histológico y grado de diferenciación son los esperables en cuanto a los tumores colo-rectales. Dado que nuestra serie estaba compuesta básicamente de tumores en fase avanzada, es lógico que la proporción de los mismos con factores

histológicos de riesgo, como permeación vascular, linfática o nerviosa, sea elevada (80.7%). Por esta misma razón ya en el estudio de la pieza quirúrgica había un 46.3 % de los casos que estaban en Estadio III (con afectación ganglionar) y el 58.1 % eran tumores localmente avanzados (pT3 o pT4).

En cuanto a la presencia de metástasis en el momento de diagnóstico, cuando el tumor estaba localizado en el recto en muchos casos no se habían detectado metástasis en el estudio de extensión, cosa que no sucede en tumores del resto del colon. En caso de detectarse metástasis, la mayoría de ellas se localizaron, como es esperable, en el hígado. El hecho de que haya una asociación entre presencia de metástasis y tratamiento no quirúrgico es lógico ya que en el grupo de tumores en los que se descarta la cirugía en la mayoría de los casos el principal motivo es porque estos pacientes tienen la enfermedad muy avanzada. Como se ha comentado, casos donde no se pudo tipificar el TNM patológico ya que no fueron quirúrgicos, se asocian con presencia de metástasis. Igualmente ocurre con los tratamientos adyuvante y neoadyuvante (estos en caso de tumores de recto): se realizan sobre todo en pacientes sin metástasis de entrada, mientras que el grupo en el que no se realizan estos tratamientos está compuesto básicamente de casos con metástasis. Los tumores de alto grado, histológicamente más agresivos, y los tumores con presencia de factores histológicos de riesgo, presentan metástasis en el momento del diagnóstico. Como es esperable los casos localmente poco avanzados (pT2) o con ganglios negativos (pN0) fueron más frecuentes entre el grupo sin metástasis.

En cuanto a los datos de supervivencia, coincide con otras series de cáncer colo-rectal la asociación de sexo masculino, metástasis simultáneas en hígado y pulmón y a presencia de metástasis óseas, con aumento de mortalidad. Estos últimos casos corresponderán a tumores más agresivos y con progresión tumoral avanzada. Lógicamente, en el grupo de pacientes

en los que no se ha podido hacer tratamiento quirúrgico y/o han sido descartados para terapia adyuvante, los índices de mortalidad también serán más elevados. Por esta razón, casos donde no se pudo tipificar el TNM patológico ya que no fueron quirúrgicos, se asocian con presencia de peor supervivencia. Lo mismo ocurre en aquellos pacientes en los que se han encontrado metástasis en el momento del diagnóstico pero en los que éstas no han podido operarse.

Como es esperable, los tumores de alto grado histológico tienen una peor supervivencia, así como algunas variantes histológicas: carcinomas mucinosos (coloides) y carcinoma con células “en anillo de sello”.

Aunque hemos visto que no hay diferencias significativas en cuanto a supervivencia y la presencia o no de mutación, es interesante constatar que hay una asociación entre mortalidad y determinados tipos de mutaciones, especialmente 12Ser, pero también 12Cys. Aunque este resultado coincide con publicaciones previas respecto a la menor supervivencia asociada a mutaciones en el codon 12 (Imamura et al, 2012), lo que llama la atención en nuestro estudio es la asociación de determinados tipos de mutaciones dentro del codon 12 con un peor pronóstico, hecho que no está recogido en la literatura. Esto tendría especial interés en el caso de la mutación 12 Cys, ya que se encuentra entre las más frecuentes de las descritas en este codon.

3.- FACTORES PRONÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS

En una primera presentación de resultados del Proyecto de Cáncer Rectal Español se compararon los resultados con los previos del proyecto noruego y se constató que los índices de RL eran similares en ambos casos (Ortiz et al, 2013). Asimismo, en el estudio noruego (Wibe et al, 2002) los índices

de afectación del margen radial, de perforación intraoperatoria del tumor, mortalidad quirúrgica y dehiscencia de anastomosis eran también similares a los del estudio español.

Los índices de RL (4.7%) y de supervivencia global (87.8%) fueron sensiblemente mejores comparados con los respectivos (10% y 75%) observados en los pacientes con resección curativa en el Proyecto de Cáncer Rectal Noruego.

Sin embargo, hay diferencias entre ambos proyectos que podrían afectar la comparación de los estudios, como son el hecho de que en el español no se incluyen hospitales que recluten menos de 10 pacientes por año, a diferencia del noruego, en el que todos los hospitales del país fueron invitados a participar. Otro factor es el hecho de que en el estudio noruego se administró radioterapia adyuvante en tan sólo un 8% de los pacientes intervenidos con intención curativa, mientras que en el presente estudio esta proporción es del 60.6%. Estas dos diferencias podrían contribuir al hecho de presentar resultados discretamente mejores en el estudio español. Apoya esta teoría el hecho de que en cuanto el Proyecto de Cáncer Rectal Noruego seleccionó los centros y aumento el uso de RMN de un 0% al 81%, aumentando también la aplicación de terapia neoadyuvante (del 5% al 20%), los índices de RL disminuyeron del 13% al 8% y la supervivencia global aumentó hasta el 73% (Bernstein et al, 2012)

Las diferencias respecto a la supervivencia global entre los dos proyectos podrían atribuirse al bajo número de pacientes que completaron los 5 años de seguimiento en ambos estudios. La iniciativa del Proyecto de Cáncer Rectal Noruego produjo un cambio en la gestión del tratamiento del cáncer de recto en otros países europeos (van Gijn et al, 2012), indicando que los programas centrados en la mejora de las competencias de los equipos multidisciplinares y en la auditoria de los resultados, consiguen que los miembros de esos equipos sean más sensibles a problemas específicos de

cáncer de recto. Una de las razones fundamentales en la mejora de de los resultados es un registro prospectivo de la información. En España, a raíz de este estudio, la dedicación de los grupos multidisciplinares ha mejorado el índice de ETM, que ha pasado de un 68.7% al principio del proyecto a incluir prácticamente a todos los pacientes en la actualidad.

Así pues, los resultados obtenidos en Noruega se pueden reproducir en grupos de población mayores implementando programas de formación de grupos multidisciplinares centrados en mejorar competencias y auditar resultados.

Nuestro estudio reproduce bastante fielmente los datos obtenidos en el estudio español en cuanto a índice de recidiva, presencia de metástasis a distancia y supervivencia (Tabla 28).

	Estudio actual	Grupo Español
Recidiva Local	3.83 %	4.7 %
Metástasis	12 %	16 %
Supervivencia	76.1 %	87.8 %

Tabla 28: Comparación de resultados entre nuestra serie y el Grupo Español..

En nuestro estudio, en cuanto a la **presencia de recidivas**, el número de casos de RL es muy bajo en relación al número total de casos estudiados (3.83%), cosa que dificulta la valoración estadística entre las diferentes variables. De todas maneras, la diferencia encontrada en cuanto a edad entre los grupos con y sin recidiva se puede explicar por el hecho de que en los pacientes con recidiva los tumores podrían ser histológicamente más agresivos o localmente avanzados, hechos que con frecuencia se dan en grupos de edad más jóvenes. De igual manera parece lógico que en tumores que han sido tratados con poca respuesta al tratamiento neoadyuvante

tengan más posibilidades de recidiva, como se ha demostrado en nuestro estudio. En cuanto a presencia de RL y calidad de resección de mesorrecto, no hemos encontrado, al contrario de lo que cabría esperar, diferencias significativas. Esto se explicaría por la presencia de pocos casos de recidiva en una población donde mayoritariamente (65.7%) se ha obtenido una resección satisfactoria del mesorrecto.

En el Proyecto Español se encontraron diferencias significativas en las variables localización del tumor ($p=0.003$) y estadio tumoral patológico ($p=0.002$), cosa que no ha pasado en nuestro grupo ($p=0.188$ y $p=0.473$ respectivamente). Tampoco se ha identificado la técnica de amputación abdominoperineal como determinante de RL en los primeros 3 años de seguimiento, aunque en dicha técnica son más frecuentes tanto la afectación del margen circunferencial como la perforación del tumor (Ortiz, Wibe et al, 2014).

Respecto a las **metástasis**, éstas se presentaron en un 12.0% de los casos. Se trataba de pacientes en los que previamente no se había detectado la presencia de las mismas, por lo tanto son pacientes en estadios I, II o III. Como parece lógico dentro de la historia natural de la enfermedad, la presencia de metástasis es significativamente superior en pacientes diagnosticados de cáncer de recto en estadio III (avanzado) respecto a estadios I y II, estadificados tanto desde un punto de vista radiológico prequirúrgico como patológico post-quirúrgico. Así pues, la presencia de ganglios linfáticos afectados, aumenta las posibilidades de que estos pacientes desarrollen metástasis. A diferencia de lo que hemos comentado con los casos de RL, llama la atención la diferencia significativa entre presencia de metástasis y calidad de resección de mesorrecto. Los pacientes con una resección de mesorrecto poco satisfactoria o incompleta tienen 3 veces más riesgo de desarrollar metástasis a distancia con respecto a

pacientes con una escisión completa del mismo. Esto puede explicarse por la propia naturaleza del tumor, en el sentido de que se traten de tumores localmente avanzados que dificulten la escisión completa de la grasa mesorrectal y que ya presenten de por sí afectación ganglionar local-regional. También se evidenció una asociación entre localización de tumor y metástasis de manera que éstas aparecen con más frecuencia en tumores de tercio inferior y medio comparándolos con tumores de tercio superior.

En cuanto a la **supervivencia**, al finalizar el estudio habían fallecido 50 pacientes. De forma parecida a lo comentado en las metástasis, la localización del tumor muestra diferencias en cuanto a riesgo de muerte si el tumor está localizado en tercio medio e inferior. Se ha demostrado también una menor supervivencia en pacientes sometidos a amputación abdominoperineal respecto a pacientes con resección anterior. De esto podemos deducir que esta técnica, que de por sí comporta una mayor morbilidad, también conlleva unos mayores índices de mortalidad. Lógicamente, la supervivencia también es menor en pacientes con tumores no resecables, en los que se realiza tan sólo estoma de derivación y/o laparotomía exploradora. La supervivencia también está relacionada con la estadificación del tumor, tanto la radiológica como la patológica, como es esperable, y coincidiendo con los datos del Proyecto Español (Ortiz et al, 2013). Este hecho se correlaciona con el grado de infiltración (T) del tumor, que se ha demostrado que es un factor también relacionado con la supervivencia, así como con el número de ganglios afectados (N) y la presencia de metástasis (M). La tasa de mortalidad en estos pacientes también está directamente relacionada con la presencia de complicaciones, con lo que podemos afirmar que tanto la fuga como dehiscencia de sutura o la infección de la herida quirúrgica son factores que ensombrecen el pronóstico, ya que están directamente asociados a una menor

supervivencia. Llama la atención la asociación directa constatada entre la calidad de resección de mesorrecto y la mortalidad. Este hecho confirma la importancia de, no sólo practicar una resección del mesorrecto lo más completa posible, sino de hacer una valoración de la misma por parte del patólogo en la pieza quirúrgica, ya que este dato es fundamental de cara a valorar el pronóstico del paciente. Actualmente es un factor pronóstico clave que puede comportar implicaciones terapéuticas posteriores en los casos en los que no se ha podido realizar una exéresis completa del mesorrecto. De igual manera, este hecho se correlaciona también perfectamente con la valoración del tumor residual (clasificación R), especialmente en los casos con tumor residual macroscópico (R2).

En el Proyecto Español se constató que la edad avanzada, el estadio TNM avanzado y la resección abdominoperineal tenían una influencia negativa sobre la supervivencia (con $p < 0.001$ en los 3 casos), cosa que también coincide con nuestro estudio, excepto en el caso de la edad, donde no encontramos diferencias significativas ($p = 0.223$). En el Proyecto Español no se han descrito asociaciones entre sexo, localización del tumor y tratamiento neoadyuvante con la supervivencia. Aunque recientemente se ha propuesto una resección extra-elevador más amplia para evitar la afectación del margen circunferencial, la perforación tumoral intraoperatoria, las recidivas y mejorar el índice de supervivencia, hasta el momento no se ha encontrado diferencias significativas con la amputación abdominoperineal convencional (Ortiz, Ciga et al, 2014).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- OSNA es un método fiable y fácilmente aplicable para obtener una mayor precisión en el estudio de ganglios linfáticos pericólicos en pacientes con cáncer de colon.

2.- OSNA consigue un índice de supraestadificación del 25% de los casos de cáncer de colon con ganglios linfáticos histopatológicamente negativos.

3.- El mapeo de GC “ex vivo” en las piezas quirúrgicas de cáncer de colon es una técnica con una especificidad satisfactoria para detectar dichos ganglios linfáticos.

4.- Las mutaciones 12Ser y 12Cys del oncogen K-Ras en los tumores colorectales metastáticos se asocian a una mayor tasa de mortalidad.

5.- En cáncer colo-rectal metastático, los tumores de alto grado y los que presentan una variedad histológica diferente al adenocarcinoma convencional ofrecen un peor índice de supervivencia.

6.- En la valoración de las piezas quirúrgicas de cáncer de recto, hay una asociación directa constatada entre la calidad de resección de mesorrecto y la progresión de la enfermedad, así como la mortalidad de estos pacientes. Podemos considerar la calidad de resección del mesorrecto como un factor predictivo de respuesta, lo que implica la necesidad de una adecuada valoración patológica de las piezas quirúrgicas.

7.- En las piezas quirúrgicas de cáncer de recto, el estadio TNM avanzado, la localización del tumor en tercios medio e inferior del recto y la resección abdominoperineal tienen una influencia negativa sobre la supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
2. Amado RG, Wolf M, Peeters M; Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:1626-34, 2008
3. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *Br J Cancer* 85:692-696, 2001
4. Armitage P: Trends for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics*. *Biometrics* 11:375-386, 1955
5. Baldus SE1, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res*. Feb 1;16(3):790-9, 2010
6. Baloch ZW, Abraham S, Roberts S, et al: Differential expression of cytokeratins in follicular variant of papillary carcinoma: an immunohistochemical study and its diagnostic utility. *Hum Pathol* 30:1166-71, 1999
7. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779, 1987
8. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, La Farina M, Albanese I, Dardanoni G, Salerno S, Tomasino RM, Labianca R, Gebbia N, Russo A. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol*. Sep;13(9):1438-46, 2002
9. Bembenek A, Schneider U, Gretschel S, Fischer J, Schlag PM. Detection of lymph node micrometastases and isolated tumor cells in sentinel and nonsentinel lymph nodes of colon cancer patients. *World J Surg*. 29:1172-1175, 2005.

10. Bernstein TE, Endreseth BH, Romundstad P, Wibe A, Norwegian Colorectal Cancer Registry. Improved local control of rectal cancer reduces distant metastases. *Colorectal Dis* 14:c668-78, 2012
11. Bertagnolli M, Miedema B, Redson M, et al. Sentinel node staging of resectable colon cancer, results of a multicenter study. *Ann Surg* 240:624–30, 2004.
12. Bilchik AJ, Nora DT, Saha S, Turner R, Wiese D, Kuo C, Ye X, Morton DL, Hoon DS: The use of molecular profiling of early colorectal cancer to predict micrometastases. *Arch Surg* , 137:1377-83, 2002.
13. Bilchik AJ, Nora DT, Sobin LH, et al: Effect of lymphatic mapping on the new tumor-nodemetastasis classification for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21:668-672, 2003
14. Bos JL, Fearon EL, Hamilton SR et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorrectal cancers. *Nature* 327:293, 1987
15. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682, 1989.
16. Bos JL. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *Embo J* 17:6776, 1998
17. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO classification of tumours of the digestive system. International Agency of Research on Cancer. Lyon, 2010.
18. Bruera G, Cannita K, Di Giacomo D, Lamy A, Troncone G, Del Mas A, Coletti G, Frébourg T, Sabourin JC, Tosi M, Ficorella C, Ricevuto E. Prognostic value of KRAS genotype in metastatic colorectal cancer (MCRC) patients treated with intensive triplet chemotherapy plus bevacizumab (FIR-B/Fox) according to extension of metastatic disease. *BMC Medicine* 10:135, 2012.
19. Bruera G, Cannita K, Di Giacomo D, Lamy A, Frébourg T, Sabourin JC, Tosi M, Alesse E, Ficorella C, Ricevuto E. Worse prognosis of KRAS c.35 G>A mutant metastatic colorectal cancer (MCRC) patients treated with intensive triplet chemotherapy plus bevacizumab (FIR-B/Fox). *BMC Medicine* 11:59, 2013.

20. Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and SOS nucleotide exchange factor. *Cell* 73:611, 1993.
21. Bulow S, Christensen IJ, Harling H et al. Recurrence and survival after mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 90:974–80, 2003
22. Cahill RA, Leroy J, Marescaux J. Could lymphatic mapping and sentinel node biopsy provide oncological providence for local resectional techniques for colon cancer? A review of the literature. *BMC Surg*. 8:17, 2008.
23. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signalling. *Oncogene* 17:1395, 1998
24. Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104:593, 2001
25. Codina A, Espín E, Biondo S et al. Audited teaching program for the treatment of rectal cancer in Spain: results of the first year. *Cir Esp* 82:209-13, 2007
26. Collet D. Modelling survival data in medical research. Boca Ratón, FL: Chapman and Hall/CRC, 1994.
27. Croner RS, Fortsch T, Bruckl WM, et al: Molecular signature for lymphatic metastasis in colorectal carcinomas. *Ann Surg* 247:803-10, 2008
28. Croner RS, Merkel S, Papadopoulos T, et al: Multivisceral resection for colon carcinoma. *Dis Colon Rectum* 52:1381-6, 2009
29. Croner RS, Schellerer V, Demund H, et al: One step nucleic acid amplification (OSNA) - a new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *J Transl Med* 8:83, 2010
30. Cserni G: Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* 65:193-9, 2012

31. Davies M, Arumugam PJ, Shah VI, et al: The clinical significance of lymph node micrometastasis in stage I and stage II colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 10:175-9, 2008
32. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304:1812-1820, 2010
33. Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 327(6120):298-303, 1987
34. van Gijn W, van den Brock CB, Mroczkowski P et al. The EURECCA project: data items scored by European colorectal cancer audit registries. *Eur J Surg Oncol* 38:467-71, 2012
35. Gray RG, Quirke P, Handley K, et al: Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 29:4611-9, 2011
36. Guller U, Zettl A, Worni 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* 118(24): 6039-6045, 2012
37. Hernández-Losa J, Sanz J, Landolfi S, López-Rios F, Palacios J, Bautista MD, Díaz-Rubio E, Tabernero J, García Foncillas J, Ramon y Cajal S. Recomendaciones para la determinación de K-RAS en cáncer de colon. *Rev Esp Patol* 45(2):76-85, 2012
38. Herold A, Lehur P-A, Matzel KE, O'Connell. *Coloproctology. European Manual of Medicine.* Berlin - Heidelberg. Springer Verlag 2008
39. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 13:606-8, 1992.
40. Hutchins G, Southward K, Handley K, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and

- benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 29:1261-1270, 2011.
41. Iddings D, Ahmad A, Elashoff D, et al: The prognostic effect of micrometastases in previously staged lymph node negative (N0) colorectal carcinoma: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 13:1386-92, 2006
42. Imamura Y, Morikawa T, Liao X, Lochhead P, Kuchiba A, Yamauchi M, Qian ZR, Nishihara R, Meyerhardt JA, Haigis KM, Fuchs CS, Ogino S. Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 BRAF wild-type colorectal cancers. *Clin Cancer Res*. Sep 1;18(17):4753-63, 2012
43. Jestin P1, Pålman L, Glimelius B, Gunnarsson U. Cancer staging and survival in colon cancer is dependent on the quality of the pathologists' specimen examination. *Eur J Cancer*. Sep;41(14):2071-8, 2005.
44. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsh FR, et al KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol* 27:1130-1136, 2009
45. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. KRAS mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359:1757-65, 2008
46. Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P, et al: Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Clin Oncol* 29:4620-6, 2011
47. Klese LJ, Parada LF. P21 ras and phosphatidylinositol-3 kinase are required for of wild-type and NF1 mutant sensory neurons. *J neurosci* 18:10420, 1998
48. Kodaz H, Hacibekiroglu I, Erdogan B, Turkmen E, Tozgir H, Albayrak D, Uzunoglu S, Cicin I. Association between specific KRAS mutations and the clinicopathological characteristics of colorectal tumors. *Mol Clin Oncol*. Jan;3(1):179-184, 2015

- 49.Langheinrich MC, Schellerer V, Perrakis A, et al: Molecular mechanisms of lymphatic metastasis in solid tumors of the gastrointestinal tract. *Int J Clin Exp Pathol* 5:614-23, 2012
- 50.Pathology practice patterns affect lymph node evaluation and outcome of colon cancer: a population-based study. Lemmens VE1, van Lijnschoten I, Janssen-Heijnen ML, Rutten HJ, Verheij CD, Coebergh JW. *Ann Oncol*. 2006 Dec;17(12):1803-9. Epub Sep 13, 2006.
- 51.Lee JK, Delaney CP, Lipman JM: Current state of the art in laparoscopic colorectal surgery for cancer: Update on the multi-centric international trials. *Ann Surg Innov Res* 6:5, 2012
- 52.Leibl S, Tsybrovskyy O, Denk H. How many lymph nodes are necessary to stage early and advanced adenocarcinoma of the sigmoid colon and upper rectum? *Virchows Arch* ; 443: 133–138, 2003.
- 53.Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol*, 21(15), 2912–2919, 2003.
- 54.Li W, Qiu T, Zhi W, Shi S, Zou S, Ling Y, Shan L, Ying J, Lu N. Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. *BMC Cancer*. May 1;15(1):340, 2015
- 55.Lips DJ, Koebrugge B, Liefers GJ, et al. The influence of micrometastases on prognosis and survival in stage I-II colon cancer patients: the Enroute plus sign in circle Study. *BMC Surg*. 11:11, 2011.
- 56.Maak M, Simon I, Nitsche U, et al: Independent Validation of a Prognostic Genomic Signature (ColoPrint) for Patients With Stage II Colon Cancer. *Ann Surg*, 2013
- 57.Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 73:2680-2686, 1994.

58. Mao C1, Huang YF, Yang ZY, Zheng DY, Chen JZ, Tang JL. KRAS p.G13D mutation and codon 12 mutations are not created equal in predicting clinical outcomes of cetuximab in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer*. Feb 15;119(4):714-21, 2013
59. Mendelsohn J, Howley P, Israel M, Gray J, Thompson C. *The Molecular Basis of Cancer*. Third Edition 2008 Saunders Elsevier ISBN 978-1-4160-3703-3
60. Merkel S, Mansmann U, Papadopoulos T, et al: The prognostic inhomogeneity of colorectal carcinomas Stage III: a proposal for subdivision of Stage III. *Cancer* 92:2754-9, 2001
61. Merkel S, Mansmann U, Siassi M, et al: The prognostic inhomogeneity in pT3 rectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 16:298-304, 2001
62. Mescoli C, Albertoni L, Pucciarelli S, et al: Isolated tumor cells in regional lymph nodes as relapse predictors in stage I and II colorectal cancer. *J Clin Oncol* 30:965-71, 2012
63. Meyer A, Merkel S, Bruckl W, et al: Cdc2 as prognostic marker in stage UICC II colon carcinomas. *Eur J Cancer* 45:1466-73, 2009
64. Morelli MP, Kopetz S. *J Clin Oncol*. Hurdles and complexities of codon 13 KRAS mutations. Oct 10;30(29):3565-7, 2012
65. Murawa D, Nowaczyk P, Hunerbein M, et al. One hundred consecutive cases of sentinel lymph node mapping in colon cancer—the results of prospective, single-centre feasibility study with implementation of immunohistochemical staining. *Int J Colorectal Dis*. 26:897-902, 2011.
66. Nagtegaal ID, van de Velde CJ, Van der Worp E, Kapitejn E, Quirke P, van Krieken JH. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist in quality control. *J Clin Oncol* 20(7):1714-15, 2002
67. Nagtegaal ID, van de Velde CJH, Marijnen CAM, van Krieken J H.J.M, Quirke P. Low Rectal Cancer : A Call for a Change of Approach in Abdominoperineal Resection-*Journal of Clinical Oncology*. 36: 9257-64, 2005

68. Nitsche U, Rosenberg R, Balmert A, et al: Integrative marker analysis allows risk assessment for metastasis in stage II colon cancer. *Ann Surg* 256:763-71; discussion 771, 2012
69. Ortiz H, Wibe A, Ciga MA, Lujan J, Codina A, Biondo S. Impact of a multidisciplinary team training programme on rectal cancer outcomes in Spain. *Colorectal Dis* 15(5):544-51, 2013
70. Ortiz H, Ciga MA, Armendariz P, Kreisler E, Codina-Cazador A, Gomez-Barbadillo J, Garcia-Granero E, Roig JV, Biondo S; Spanish Rectal Cancer Project. Multicentre propensity score-matched analysis of conventional versus extended abdominoperineal excision for low rectal cancer. *Br J Surg*. Jun;101(7):874-82, 2014
71. Ortiz H, Wibe A, Ciga MA, Kreisler E, Garcia-Granero E, Roig JV, Biondo S; Spanish Rectal Cancer Project. Multicenter study of outcome in relation to the type of resection in rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. Jul;57(7):811-22, 2014
72. Osako T, Iwase T, Kimura K et al Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: a comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer* 117:4365–4374, 2011
73. Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, Siena S, Zhang K, Williams R, Wiezorek J. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol*. Feb 20;31(6):759-65, 2013
74. Quirke P, Steele R, Monson J, Grieve R, Khanna S, Couture J, O'Callaghan C, Sun Myint A, Bessell E, Thompson LC, Parmar M, Stephens RJ, Sebag-Montefiore D, on behalf of the MRC CR07/NCIC-CTG CO16 trial investigators and the NCRI colorectal cancer study group. *Lancet* 373: 821–28, 2009
75. Rahbari NN, Bork U, Mutschall 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* 30:60-70, 2012

76. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan : results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 27:5931-5937, 2009
77. Rosenberg R, Hoos A, Mueller J, et al: Prognostic significance of cytokeratin-20 reverse transcriptase polymerase chain reaction in lymph nodes of node-negative colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 20:1049-55, 2002
78. Ruiz López P, Alcalde J, Rodríguez-Cuéllar E, Landa I, Jaurrieta E, Proyecto nacional para la gestión clínica de procesos asistenciales. Tratamiento quirúrgico del cáncer colorrectal. I. Aspectos generales. *Cir Esp* 71:173-80, 2002
79. Salazar R, Roepman P, Capella G, et al: Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol* 29:17-24, 2011
80. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A et al. High frequency of mutations of the PI3KCA gen in human cancers. *Science* 304:554, 2004.
81. Santos E, Nebreda AR. Structural and functional properties of Ras proteins. *Faseb J* 3:2151, 1989.
82. Sargent D, Sobrero A, Grothey A, et al: Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 27:872-7, 2009
83. SAS Institute Inc. (2010a) *SAS/STAT* 922 User's Guide: SAS Proprietary Software 9.2 Cary NC, USA.
84. SAS Institute Inc. (2010b) *SAS/STAT* 9,2 User's Guide: Introduction to Statistical Modeling with *SAS/STAT Software*, SAS Proprietary Software 9.2 Cary NC, USA.
85. Schubert S1, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):295-308.

86. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, Yu H, Oliner KS, Go WY. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2014 Jul 20;32(21):2240-7. doi: 10.1200/JCO.2013.53.2473. Epub 2014 Mar 31.
87. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a *Cell* 88:593, 1997
88. Shi Ch, Washington K. Molecular testing in colorectal cancer. *Diagnosis of Lynch Syndrome and Personalized Cancer Medicine. Am J Clin Pathol* 137:847-859, 2012.
89. Smith AJ, Law CH, Khalifa MA et al. Multimodal CME for surgeons and pathologists improves colon cancer staging. *J Cancer Educ* ; 18: 81–86, 2003.
90. 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* 13:4807-16, 2007
91. Uen YH, Lin SR, Wu DC, et al: Prognostic significance of multiple molecular markers for patients with stage II colorectal cancer undergoing curative resection. *Ann Surg* 246:1040-6, 2007
92. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. Jan;223(2):219-29. doi: 10.1002/path.2796. Epub 2010 Oct 28, 2011.
93. Viehl CT, Guller U, Cecini R, Langer I, Ochsner A, Terracciano L, Riehle HM, Laffer U, Oertli D, Zuber M Sentinel lymph node procedure leads to upstaging of patients with resectable colon cancer. Results of the Swiss prospective, multicenter study sentinel lymph node procedure in colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2011; publicado online 10 Febrero 2012.
94. Vogelaar FJ, Reimers MS, van der Linden RIA, van der Linden JC, Smit VTHBM, Lips DJ, van de Velde CJH, Bosscha K. The

- diagnostic value of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for sentinel lymph nodes in colon cancer patients. *Ann Surg Oncol* 21:3924-30, 2014.
95. Wanebo HJ, LeGolvan M, Paty PB, Saha S, Zuber M, D'Angelica MI, Kemeny ME. Meeting the biologic challenge of colorectal metastases *Clin Exp Metastasis* 29;7: 829-39, 2012.
96. Watanabe T, Yoshino T, Uetake H, Yamazaki K, Ishiguro M, Kurokawa T, Saijo N, Ohashi Y, Sugihara K. KRAS mutational status in Japanese patients with colorectal cancer: results from a nationwide, multicenter, cross-sectional study. *Jpn J Clin Oncol*. Jul;43(7):706-12, 2013
97. Wellbrock C, Karasarides M; Marais R. The RAF proteins take center stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:875, 2004
98. West NP, Hohenberger W, Weber K, et al: Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *J Clin Oncol* 28:272-8, 2010
99. Wibe A, Møller B, Norstein J et al. Norwegian Rectal Cancer Group. A national strategic change in treatment policy for rectal cancer-implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway, a national audit. *Dis Colon Rectum* 45:857-66, 2002
100. Wibe A, Eriksen MT, Syse A, Tretli S, Myrvold HE, Søreide O, Norwegian Rectal Cancer Group. Effect of hospital caseload on long-term outcome after standardization of rectal cancer surgery at a national level. *Br J Surg* 92:217-24, 2005
101. Wittinghofer A, Scheffzek K, Almadian MR. The interaction of Ras with GTPase-activating proteins *FEBS Lett* 410:63, 1997.
102. Wolf B, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery*. New York, Springer 2007.
103. 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* 18:1891-8, 2011

104. Yamamoto N, Daito M, Hiyama K, 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