



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN Y CIENCIAS MÉDICAS
SALVADOR ZUBIRÁN
CAMPO DEL CONOCIMIENTO: ANATOMÍA PATOLÓGICA

“Factores histopatológicos predictores de respuesta patológica completa del adenocarcinoma rectal en etapa localmente avanzada al tratamiento con quimio y radioterapia preoperatoria”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

LEONARDO SAÚL LINO SILVA

TUTOR: Dr en C. ARMANDO GAMBOA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. Planteamiento del problema.....	3
2. Justificación.....	5
3. Hipótesis de trabajo:.....	6
4. Objetivos.....	6
5. Material y método.....	7
6. Resultados.....	13
7. Discusión.....	17
8. Referencias.....	22

1. Planteamiento del problema.

El carcinoma rectal es uno de los cánceres más frecuentes ocupando el tercer lugar en frecuencia solo detrás del cáncer de pulmón, de mama y próstata, pero es el segundo en mortalidad por cáncer.¹ El estándar de tratamiento de esta neoplasia en estadios localmente avanzados (etapa clínica III) es el uso de la quimioterapia y radioterapia combinadas preoperatorias (QRTn) con el fin de disminuir el tamaño tumoral, inducir cambios favorables en la estadificación de la enfermedad, aumentar la probabilidad de preservación del esfínter anal, disminuir la incidencia de recurrencia local y la posibilidad de lograr una respuesta patológica completa (RPC), es decir, la involución total del tumor.^{2,3} El esquema preferido de QRTn es un esquema largo de 45 Gy a la pelvis más sobreimpresión de 5,4 Gy en 5 semanas, asociado a 5-fluoruracilo (5-FU).^{4,5}

La RPC se define como la ausencia de células neoplásicas viables en la pieza quirúrgica y se observa en un 10 a 30% de los pacientes con QRTn.⁶⁻⁹ Varios estudios sugieren que la RPC se relaciona con un mejor control local de la enfermedad, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.^{6,10,11} Desafortunadamente la RPC es conocida sólo con el estudio histopatológico de la pieza operatoria por lo que en teoría, elementos que pudieran anticipar una RPC en la biopsia pre-tratamiento serían de mucha utilidad, ya que los hallazgos en la biopsia preoperatoria (post QRTn), el examen endoscópico o los estudios de imagen 6 a 8 semanas después de terminada la QRTn, no han demostrado ser métodos suficientemente sensibles y específicos para predecir la RPC.

Histopatológicamente se han analizados varios marcadores de inmunohistoquímica y moleculares en la biopsia preoperatoria (pos QRTn) en un intento por predecir dicha respuesta, pero con resultados contradictorios.¹² Si se identificara un factor (o factores) histopatológicos,

genéticos o moleculares de los tumores que responderán completamente a la QRTn se podría evitar realizar la resección radical del recto, un procedimiento mórbido y que merma la calidad de vida del paciente.

Entendiendo que el daño fundamental causado por la nQRT es el daño nuclear directo, se han estudiado proteínas asociadas a la fragmentación nuclear como BCL-2 ó P21, entre otros.¹³ El estado del complejo de reparación del ADN por apareamiento incorrecto (*Mismatch repair*, *MMR*) es un factor candidato plausible, pues al dañarse el ADN y no repararse de manera adecuada es razonable considerar que dicho tumor no tiene capacidad de regenerarse.¹⁴ Al momento de iniciar este estudio, no hay trabajos que hayan intentado definir si está relacionado con la respuesta al tratamiento con quimio y/o radioterapia. La radioterapia administra radiación ionizante a las células diana, con el objetivo de inducir la muerte mediante daño al ADN, como la apertura de la doble cadena. En respuesta, una red muy compleja y no del todo comprendida de vías moleculares intracelulares descrita como respuesta al daño al ADN se activa. Dentro de estos mecanismos, la expresión de proteínas MMR aumenta, en especial MSH2, MSH6, MLH1 y PMS2.¹⁵ Por lo tanto, células cancerosas que son deficientes en la reparación del ADN pueden ser especialmente propensas a la muerte por estos agentes que inducen daño genético.

Otros factores candidatos para predecir esta respuesta son el grado de diferenciación tumoral, la invasión vascular o perineural, la ausencia de expresión de CDX2 (una proteína asociada a la integridad de las membranas celulares del cáncer colorectal), la respuesta inmunológica al tumor y las células del frente invasor tumoral (gemación tumoral). Este último factor ha recibido recientemente mucha atención en oncología, ya que se ha asociado con el fenómeno denominado transición epitelial/mesenquimal de las células tumorales, fenómeno que les confiere mayor resistencia a factores que causan daño celular y mal pronóstico.

2. Justificación.

Identificar en las biopsias iniciales de los pacientes con adenocarcinoma rectal candidatos a QRTn datos histológicos asociados con RPC podría evitar realizar la resección radical del recto una vez concluida la QRTn, hecho que reduciría riesgos al paciente, mejoraría su calidad de vida y representaría un ahorro económico para el paciente y las instituciones de salud.

En este trabajo se pretende identificar factores asociados a mayor tasa de RPC en las biopsias iniciales de los pacientes sometidos a resección radical posterior a QRTn. En particular, se pretende determinar si los pacientes con adenocarcinoma rectal con sistema MMR deficiente (dMMR) se asocian con mayor tasa de RPC a QRTn respecto a los casos con sistema MMR eficiente (eMMR). Secundariamente se buscará caracterizar si el microambiente inflamatorio asociado al tumor, la expresión de CDX2, la presencia de lesiones precursoras y la gemación tumoral se asocian con la tasa de RPC.

3. Hipótesis de trabajo:

Los casos de adenocarcinoma rectal con sistema MMR defectuoso mostrarán mayor tasa de respuesta patológica completa posterior a tratamiento preoperatorio con quimio y radioterapia, con un $OR \geq 2.0$, comparado con casos con un sistema MMR eficiente.

4. Objetivos

a) Objetivo General

Determinar si el estado deficiente de las proteínas MMR está asociado con un aumento en la proporción de casos de RPC en pacientes con carcinoma rectal con QRTn.

b) Objetivos secundarios.

- Determinar si una mayor respuesta inflamatoria asociada al tumor, expresada como linfocitos intraepiteliales o agregados linfoides peritumorales, se asocia con mayor RPC a QRTn.
- Determinar si la pérdida de expresión de la proteína CDX2 evaluada por inmunohistoquímica se asocia con mayor RPC a QRTn.
- Determinar si el grado de gemación tumoral se asocia con la RPC a QRTn.
- Determinar si la presencia de lesiones precursoras (adenomas) se asocia con mayor RPC a QRTn.

5. Material y método.

a). Diseño.

Se realizará un *estudio de casos y controles* con pareamiento 1:2 en medio hospitalario.

b). Población de estudio (pacientes y muestras).

De una base de datos de pacientes con cáncer rectal llevada de 2010 a junio de 2017 (mantenida prospectivamente) se identificarán aquellos con adenocarcinoma del tercio medio o inferior del recto en etapa clínica III que recibieron QRTn con esquema completo en el Instituto Nacional de Cancerología de México. De cada uno de ellos se conoce si tuvo o no RPC. De cada paciente se obtendrán del archivo de bloques del departamento de Anatomía Patológica las biopsias de recto iniciales (donde se realizó el diagnóstico de cáncer) para realizar el análisis histopatológico y estudios de inmunohistoquímica en caso necesario.

c). Desenlace.

El desenlace de interés es la presencia o no de RPC.

d). Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Criterios de inclusión. Pacientes mayores de 16 años con cáncer de recto etapa clínica preoperatoria III con carcinoma en el tercio medio o inferior del recto, que hayan recibido QRTn (45 Gy y 3 a 6 ciclos de quimioterapia), que posteriormente hayan sido sometidos a resección radical de recto entre 6 y 8 semanas de concluida la QRTn y que cuenten con material histológico para ser analizado. Los especímenes quirúrgicos debieron haberse evaluado sistemáticamente en patología mediante el procedimiento recomendado por Quirke y estandarizado en nuestra institución⁹⁻¹¹.

Criterios de exclusión. Historia previa de tratamiento con quimioterapia o radioterapia por alguna otra neoplasia, tumor en tercio superior de recto o unión recto-sigmoidea y ausencia de material patológico para ser analizado.

Criterios de eliminación. Desgaste del bloque al realizar estudios adicionales.

e). Definiciones de casos y controles.

Definición de casos: individuos con cáncer rectal que posterior a QRTn no muestran evidencia histológica de neoplasia residual en el espécimen de resección.

Definición de controles: Individuos con cáncer rectal que muestran evidencia histológica de neoplasia residual posterior a QRTn. Se buscarán 2 controles por caso pareados por sexo y por edad (dentro de un intervalo de ± 5 años).

f). Tamaño de la muestra.

Se calculó mediante diferencia de proporciones buscando un OR de 2.0 para el objetivo primario.

Fórmula:
$$n = \left(\frac{r+1}{r}\right) \frac{p(1-p)(Z_{\beta} + Z_{\alpha/2})^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde:

n = El tamaño de la muestra que queremos calcular por grupo.

r = numero de control dividido por el número de casos, en nuestro caso es 2, ya que el pareamiento es 2 controles por caso.

$Z_{\alpha/2}$ = Es la desviación del valor medio que aceptamos para lograr el nivel de confianza deseado. El nivel de confianza será del 95% ($Z_{\alpha/2}=1.96$)

Z_{β} = Es la desviación del valor medio que aceptamos para lograr el poder estadístico deseado. El poder estadístico será del 80% ($Z_{\beta}=0.84$)

p_1-p_2 = tamaño del efecto (diferencia entre la proporción conocida y la que esperamos encontrar).

p_2 = Es la proporción conocida (0.14)¹⁵.

p_1 = Es la proporción que esperamos encontrar. Con la siguiente fórmula para conseguirla con un OR de 2.0, resulta de 0.24.

$$P_{caseexp} = \frac{OR p_{controlsexp}}{P_{controlsexp}(OR - 1) + 1}$$

p (barra arriba, circulada en rojo) = promedio de proporción de expuestos ($(p_1+p_2 / 2) = 0.192$)

Con base en la formula, el tamaño de muestra por grupo es 61. Considerando pérdidas del 10% totaliza 67 casos y 134 controles.

g). Métodos.

Una vez identificados los casos y los controles se registraron datos demográficos, clínicos e histopatológicos. La etapificación preoperatoria se obtuvo por datos clínicos y de imagen asentados en el expediente y se clasificó según la séptima edición de la clasificación TNM del *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.¹⁶ Se identificó la biopsia inicial donde se realizó el diagnóstico de adenocarcinoma y se revisaron por microscopía de luz las preparaciones histológicas y bloques de parafina.

Se determinó la expresión de proteínas MMR (MLH1, MSH-2, MSH-6, PMS2) mediante inmunohistoquímica. En el 60% de las muestras se contaba con los marcadores referidos, en el resto se realizaron los estudios en el corte completo del tejido.

Tres patólogos calificaron si la expresión fue presente o ausente de acuerdo a los siguientes criterios validados y recomendados en guías:¹⁷

- La expresión nuclear de los cuatro marcadores en cada muestra clasifica el tumor como con un sistema MMR eficiente (eMMR).
- La ausencia de expresión nuclear de alguno de los marcadores en cada muestra clasifica el tumor como con un sistema MMR deficiente (dMMR).

Para caracterizar el infiltrado inflamatorio, se determinó el patrón de infiltración por linfocitos, ya sea peritumoral (en forma de agregados linfoides) e intratumoral por milímetro cuadrado. Dicha evaluación se realizó en la región de mayor inflamación (*hot spot*).

Para caracterizar la expresión de CDX2, se evaluó mediante inmunohistoquímica en corte completo del tejido y se consideró presente cualquier marca nuclear en cualquier porcentaje de células neoplásicas, así como ausente cuando no hubo dicha marcación.

La presencia de adenoma se evaluó en la biopsia inicial que contiene tumor, y se asentó como presente cuando se identificaron al menos tres glándulas con cambios adenomatosos (displasia de grado bajo), con crecimiento vellosos o tubular, y que estaba asociados a una mucosa rectal normal.

La evaluación de la gemación tumoral se llevó a cabo examinando 0.785 mm² de superficie siguiendo los lineamientos descritos por Lugli et al.¹⁸

El resto de variables analizadas se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Definición de variables capturadas.			
Variable	Definición	Unidad de medición y/o categorías	Tipo
Edad	Edad al momento del diagnóstico.	Año	Cuantitativa discreta
Sexo	Genero determinado por características genitales.	Hombre Mujer	Cualitativa nominal
Nivel de invasión tumoral	Profundidad de invasión tumoral clasificada clínicamente mediante estudios de imagen y ultrasonido endoscópico, según la AJCC/UICC TNM 7ª edición (2010) ¹⁸ .	cT1. Invasión a submucosa. cT2. Invasión a muscular propia. cT3. Invasión a adventicia. cT4a. Invasión a serosa. cT4b. Invasión a órganos adyacentes.	Cualitativa ordinal
Metástasis ganglionares	Presencia o ausencia de metástasis ganglionares clasificada así mediante estudios de imagen y de ultrasonido.	cN0. Sin metástasis ganglionar. cN1. Metástasis en uno o más ganglios regionales.	Cualitativa nominal
Metástasis	Presencia de metástasis al momento de la resección quirúrgica identificadas intraoperatoriamente. Preoperatoriamente se habían seleccionado casos sin evidencia de enfermedad metastásica por estudios de imagen.	cM0. Sin metástasis a distancia. cM1. Metástasis a distancia.	
Invasión linfovascular	Invasión del tumor a vasos linfáticos identificada en la biopsia inicial pre-tratamiento.	Ausente Presente	Cualitativa ordinal
Invasión perineural	Invasión del tumor a perineurio.	Ausente. Presente.	Cualitativa ordinal.
Grado histológico y grado de gemación tumoral.	Grado de diferenciación tumoral según criterios de la OMS, basado en porcentaje de formaciones glandulares y subtipos. Grado histológico según gemación (Lugli et al, 2017). En un área de 0.785 mm ² se cuenta el número de yemas tumorales (grupos de 1 a 5 células sueltas en el	G1: Bien diferenciado, formación de glándulas en > 90% del tumor. G2: Moderadamente diferenciado, formación de glándulas en 50-90% del tumor. G3: Poco diferenciado, formación de glándulas en < 50% del tumor o tipos histológicos de alto riesgo como micropapilar, cribiforme, mucinoso, anillo de sello. Grado 1: 0-4 yemas / 0.785 mm ² Grado 2: 5-9 yemas / 0.785 mm ² Grado 3: 10 o más yemas / 0.785 mm ²	Cualitativa ordinal.

	estroma adyacente al frente invasor del tumor, en el área de mayor densidad de las mismas).		
Respuesta patológica	Involución del tumor identificado en la pieza quirúrgica, tanto en la pared rectal como en ganglios linfáticos, clasificado según criterios del Colegio Americano de Patología.	Sin respuesta completa. Con respuesta completa.	Cualitativa nominal.
Seguimiento	Tiempo de seguimiento desde el inicio del tratamiento con quimioterapia hasta la fecha de la última consulta o del desenlace.	Meses	Cuantitativa discreta.
Expresión de proteínas de reparación del DNA por apareamiento incorrecto (<i>Miss Match Repair</i> , MMR).	Clasificación de los tumores de acuerdo a si el sistema MMR es eficiente o defectuoso.	0. eMMR. MMR eficiente. Se clasificará así cuando todas las proteínas de MMR (MSH2, MSH6, PMS2 o MLH1) están expresadas por inmunohistoquímica. 1. dMMR. MMR defectuoso. Se clasificará así cuando una o más de las proteínas de MMR (MSH2, MSH6, PMS2 o MLH1) están ausentes por inmunohistoquímica.	Cualitativa nominal.
Tercio inferior de recto	Segmento entre los márgenes del ano y 7 cm proximales; tercio medio entre 7 y 11 cm.	No aplica	No aplica
Tercio medio de recto	Segmento entre los entre 7 y 11 cm del margen anal.	No aplica	No aplica
Adenoma en biopsia	Identificación en la biopsia pre tratamiento de un componente de adenoma adyacente al carcinoma invasor.	Ausente Presente.	Cualitativa nominal
Agregados linfoides peritumorales	Presencia de agregados linfoides (grupo de más de 20 linfocitos) adyacentes a la neoplasia invasora, evaluados por milímetro cuadrado.	Número de agregados linfoides por milímetro cuadrado. Presencia o ausencia de agregados linfoides.	Cuantitativa discreta. Cualitativa nominal
Linfocitos intratumorales	Presencia de linfocitos en el espesor del epitelio glandular neoplásico, expresado como número de linfocitos por milímetro cuadrado. Se evaluarán 5 campos de alto poder y se obtendrá el promedio para generar el número de	Número promedio de linfocitos intraepiteliales por milímetro cuadrado. 0. Ausencia de linfocitos intratumorales. 1. Presencia de linfocitos	Cuantitativa continua Cualitativa nominal

	linfocitos intratumorales por milímetro cuadrado.	intratumorales.	
Expresión de CDX2	Expresión nuclear por inmunohistoquímica de CDX2.	0. Ausente. 1. Presente.	Cualitativa nominal.

h). Análisis de datos.

Se realizó la captura de datos con el programa Microsoft Excel 2010 y se analizaron con el programa SPSS ver. 22.0 (IBM, California, USA). Se calcularon los estimadores de riesgo (*Odds ratio*, OR) de exposición entre casos y controles para el estatus de las proteínas MMR y demás variables estudiadas y se contrastaron con una chi cuadrada con nivel de significancia alfa ≤ 0.05 a dos colas.

Para la comparación de variables entre grupos se utilizó una prueba T de Student o U de Mann-Whitney –según distribución– para comparar variables numéricas y Chi cuadrada o exacta de Fischer para comparar variables categóricas. Se realizó análisis multivariado con regresión logística binaria para determinar los factores independientes predictores de respuesta patológica completa. En este análisis, los componentes del modelo fueron aquellas variables identificadas como estadísticamente significativos ($p < .05$) en los análisis univariados. Se reportaron los resultados del modelo que estimó con mayor precisión el efecto evaluado.

6. Resultados.

Población y características clínicas.

Se identificaron 72 casos con RPC, por lo que se eligieron 144 controles, para una muestra total de 216. La media de edad fueron 56.8 años con desviación estandar de 12.5 años

(intervalo de 20-83 años) y 192 casos (88.9%) se presentaron en pacientes mayores de 40 años. De los 216 casos, 140 se presentaron en hombres (64.8%).

Al momento de la presentación (biopsia inicial), respecto a su estadificación clínica pretratamiento, 123 casos (56.9%) tenían un tumor en recto con etapa cT3, mientras que 44 (20.4%) tenían etapa cT2, 31 (14.4%) tenían etapa cT4a y 18 (8.3 %) fueron calificados en etapa cT4b. Cabe resaltar que los pacientes con etapa cT2 debido a que tenían ganglios clínicamente positivos, fueron clasificados en etapa clínica III y recibieron QRTn. Respecto a los ganglios, mediante estudios radiológicos (Tomografía computada) y ultrasonido endoscópico, 77 pacientes (35.6%) fueron clasificados como portadores de enfermedad ganglionar.

Características patológicas.

Del total de tumores, 109 fueron grado 3, correspondiendo a 50.5%, mientras que 57 (26.4%) fueron grado 1 y 50 (23.1%) grado 2. El grado tumoral dado por gemación tumoral fue grado 1 en 107 (49.5%), grado 2 en 64 (29.6%) y grado 3 en 45 (20.8%), con una media de 6.25 yemas / 0.785 mm^2 con desviación estándar de 5.73 yemas (intervalo de 0-45). En 65 casos (30.1%) se identificó un adenoma, mientras que en 23 casos (10.6%) se identificó permeación linfovascular.

Respecto al infiltrado inflamatorio asociado al tumor, principalmente se observaron linfocitos y células plasmáticas, sin predominancia de algún subtipo, en 41 casos (19%) se presentaron agregados linfoides nodulares inmediatamente adyacentes a las células neoplásicas (en 36 casos se identificó sólo un agregado y en el resto más de dos). La media del número de linfocitos intratumorales observados por milímetro cuadrado fue de 1.69 con una desviación estándar de 1.74 (intervalo de 0 a 10).

De los 216 casos, se demostró un sistema dMMR en 63 pacientes (29.2%), con las principales alteraciones en la ausencia de expresión de PMS2 (ausente en 22.7%) y MLH1 (22.2%), seguidas de MSH6 (7.4%) y MSH2 (5.1%). CDX2 se expresó en 201 casos (93.1%).

Análisis bivariado.

Las características basales de ambos grupos son resumidas en el cuadro 2, donde se resume que los tumores con mayor tasa de RPC se asociaron con tumores grado 1, dMMR, mayor presencia de linfocitos intratumorales, ausencia de invasión vascular y presencia de adenoma residual en la biopsia pre-tratamiento. Al realizar un análisis de asociación con ORs, los factores que se asociaron estadísticamente con la presentación de RPC fueron el estado deficiente de las proteínas MMR, la ausencia de invasión linfovascular y baja gemación tumoral (4 o menos yemas en 0.785 mm^2) (cuadro 3).

Análisis multivariado.

Los factores histológicos independientes asociados con RPC fueron un estado dMMR, la presencia de adenoma y un grado bajo de gemación tumoral (cuadro 3). El modelo de regresión creado permite clasificar adecuadamente 71.3% de los casos que tendrán pCR al analizar estos tres factores (MMR estatus, adenoma y baja gemación) en la biopsia inicial pretratamiento, con una sensibilidad de 68.6% y especificidad de 79.2%.

Cuadro 3. Análisis de 216 pacientes con carcinoma rectal con quimio-radioterapia preoperatoria, respecto a su asociación con presencia de respuesta patológica completa.

Cuadro 2. Características clinico-patológicas de 216 pacientes con carcinoma rectal con quimio-radioterapia preoperatoria, divididos por tipo de respuesta patológica.

	Sin respuesta patológica completa, n (%) (n=144)	Respuesta patológica completa, n (%) (n=72)	<i>p</i>
Media de edad en años \pm desviación estándar.	56.67 \pm 11.94	57.22 \pm 13.65	.759
Sexo			1.0
Mujer	48 (33.3)	24 (33.3)	
Hombre	96 (66.7)	48 (66.7)	
Grado histológico			
G1	30 (20.8)	27 (37.5)	
G2	44 (30.6)	6 (8.3)	<.001
G3	70 (48.6)	39 (54.2)	.147
Grado de gemación			
Grado 1 (0-4 yemas)	63 (43.8)	44 (61.6)	.045*
Grado 2 (5-9 yemas)	46 (31.9)	18 (25)	.087
Grado 3 (10 o más yemas)	35 (24.3)	10 (13.9)	.026
Miss match repair estatus			
MMR eficiente	112 (77.8)	41 (56.9)	.001
MMR defectuoso	32 (22.2)	31 (43.1)	
Expresión de CDX2			
Ausente	8 (5.6)	7 (9.7)	.195
Presente	136 (94.4)	65 (90.3)	
MLH1			
Alterado	22 (15.3)	26 (36.1)	.001
Normal	122 (84.7)	46 (63.9)	
PMS2			.001
Alterado	23 (16)	26 (36.1)	
Normal	121 (84)	46 (63.6)	
MSH2			.010
Alterado	11 (7.6)	0	
Normal	133 (92.4)	72 (100)	
MSH6			.462
Alterado	12 (8.3)	4 (5.6)	
Normal	132 (91.7)	68 (94.4)	
Media de linfocitos intratumorales \pm desviación estándar.	1.38 \pm 1.44	2.32 \pm 2.10	<.001
Adenoma			
Ausente	114 (79.2)	37 (51.4)	<.001
Presente	30 (20.8)	35 (48.6)	
Invasión linfovascular			
Ausente	130 (90.3)	63 (87.5)	.532
Presente	14 (9.7)	9 (12.5)	

	Análisis univariado			Análisis multivariado*		
	Odds ratio	<i>P</i>	I.C. 95%	Hazard ratio	<i>P</i>	I.C. 95%
MMR estatus (deficiente vs. eficiente)	2.64	.002	1.438-4.87	2.61	.004	1.355-5.040
Expresión de CDX2 (presente vs. ausente)	.546	.262	.19-1.57			
Invasión linfovascular (presente o ausente)	0.70	.094	0.066-2.86			
Adenoma (presente vs. ausente)	3.59	<.001	1.94-6.63	3.59	<.001	1.883-6.850
Grado (G1-G2 vs. G3)	1.24	.442	.709-2.203			
Gemación tumoral (Alta gemación (≥ 5 yemas vs. baja gemación (≤ 4)))	.495	.017	.278-.881	0.619	.025	.366-.894
Agregados linfoides (presentes vs. ausentes)	1.194	.624	.587-2.429			
Linfocitos intratumorales (presentes vs. ausentes)	1.031	.920	.570-1.866			
* Ajustado por edad y sexo.						

7. Discusión

En este estudio se evaluó la asociación de características patológicas con RPC, incluyendo expresión de proteínas MMR, infiltrado inflamatorio y gemación tumoral, en la biopsia inicial antes de la QRTn en pacientes que recibieron cirugía para cáncer de recto localmente avanzado. Se identificó una asociación independiente de dMMR, la presencia de adenoma y la gemación tumoral con la RPC. El infiltrado inflamatorio no se asoció con mayor tasa de RPC. Nuestro estudio es el primero en demostrar que un sistema dMMR y la gemación tumoral podrían ser factores independientes asociados a RPC en pacientes con cáncer de recto.

La predicción de la RPC a la QRTn es un área de investigación actual muy concurrida. A pesar de los muchos estudios que informan algunos resultados prometedores en características clínicas, radiológicas, patológicas o moleculares, pocos han demostrado una capacidad de

predecir la respuesta con la adecuada sensibilidad o especificidad para guiar una decisión clínica. Este se explica porque es un fenómeno complejo que no es determinado por uno o unos cuantos factores, sino que se explica por la conjunción de varios parámetros que conocemos poco, pero que deben englobar variables clínicas, radiológicas, patológicas y moleculares, tanto basales como posteriores a QRTn. En particular, las características clínico-patológicas preoperatorias tienen una capacidad limitada para predecir la respuesta a la QRTn. Pocos estudios han investigado la relación entre las características histopatológicas pretratamiento y la RPC. Tres estudios identificaron que la RPC se asoció con buena diferenciación tumoral, diámetro tumoral pequeño, estadio temprano de T y N en estudios de imagen y niveles bajos de antígeno carcinoembrionario previo al tratamiento.¹⁹⁻²¹ Además, se ha demostrado que los tumores no circunferenciales y no ulcerados predicen una RPC, mientras que la mala respuesta al tratamiento se asocia con tumores T4 y una pobre diferenciación histológica.^{20,21} Estos estudios, sin embargo, muestran sensibilidad y especificidad pobres y sus resultados han sido contradichos por otros estudios.^{22,23}

En cuanto a los posibles factores histopatológicos que podrían predecir la muerte del tumor en la biopsia previa al tratamiento, consideramos varios factores plausibles de los cuales encontramos asociados tres. En primer lugar, el complejo MMR de la reparación del ADN explica más proporción de RPC debido a que una célula con defectos en la reparación del ADN contra el daño tiene menor capacidad de subsistir. Este mecanismo en la respuesta al cáncer rectal ha sido poco estudiado debido al acuerdo general de que el dMMR predice una respuesta deficiente a la fluoropirimidina adyuvante,²⁴ sin embargo, su impacto en la respuesta a la fluoropirimidina administrada con radiación neoadyuvante es controvertido. De la misma manera, varios estudios han investigado recientemente los roles predictivos y pronósticos (con

respecto a la supervivencia y recurrencia) de los genes MMR en el cáncer colorrectal; Sin embargo, los resultados aún no están claros.²⁵⁻²⁷ Dos grupos de estudio han abordado recientemente (pero no concluyentemente) este tema. Huh *et al*²⁸ evaluaron la expresión de la proteína MMR por inmunohistoquímica tanto en biopsias pretratamiento como en muestras patológicas postratamiento de 209 pacientes con cáncer rectal localmente avanzado sometidos a QRTn y cirugía radical donde se observó una RPC en 30 pacientes (14,4%) con expresión de MLH1, MSH2 y MSH6 que no fueron significativamente diferentes entre los grupos (no se determinó PMS2). En otro trabajo retrospectivo, de Rosa *et al*²⁹ estudiaron 62 pacientes con el objetivo de demostrar el pronóstico de tumores dMMR, identificaron 40 pacientes con enfermedad clínica en estadio II o III, 30 (75%) recibieron nCRT y 29 de ellos fueron posteriormente sometidos a resección (un paciente con respuesta clínica y radiológica completa declinó la cirugía) y 8 (27,6%) pacientes tuvieron RPC. La RPC observada fue elevada en comparación con la tasa de 18% reportada por Brouquet *et al*.³⁰ (es decir, no hubo un grupo comparativo en este estudio). Como evidencia, estas son algunas pruebas que señalan el posible valor de las proteínas MMR en la predicción de RPC. Nuestros resultados aportan un poco de claridad porque demostramos en un estudio más controlado el aumento de RPC en pacientes con sistema dMMR.

El segundo factor, la gemación tumoral, tampoco se ha estudiado en este contexto. Varias publicaciones han informado que la gemación tumoral, definido como células tumorales individuales o grupos pequeños de hasta cinco células tumorales en el margen invasivo, como un factor pronóstico adicional en el cáncer colorrectal.³¹⁻³³ Dependiendo del estudio, se observa gemación tumoral en aproximadamente 40 % de casos.³⁴ Se cree que este fenómeno es el primer paso en la transición a un cáncer metastásico, se cree que las células migran a través de la matriz

extracelular, invaden las estructuras linfovascuales y forman colonias de tumores metastásicos en los ganglios linfáticos y sitios distantes.³⁵ Aunque las células de estas yemas son consideradas como la representación histológica de la transición epitelial-mesenquimal (EMT), esta hipótesis no ha sido validada hasta el momento y los mecanismos por los cuales las células de la gemación se separan del tumor principal no están claros. De hecho, hasta ahora, sólo se han realizado estudios inmunohistoquímicos en un intento de desentrañar la base biológica de la yema tumoral.³⁶ Por tanto, se requiere un estudio genético en profundidad sobre estas yemas tumorales para revelar mecanismos moleculares subyacentes, lo cual puede ser de gran valor en la comprensión de la dinámica invasiva de la migración del cáncer, invasión y metástasis.

Las células tumorales que muestran EMT se caracterizan por la pérdida de genes asociados con la diferenciación epitelial y la adquisición de propiedades mesenquimatosas.³⁷ Una de las características de EMT es la regulación negativa de la E-cadherina, una molécula transmembrana de adhesión célula-célula necesaria para la formación de los enlaces adherentes que durante la EMT se transloca al núcleo donde funciona como un factor de transcripción oncogénico que induce la regulación positiva de factores de transcripción relacionados con EMT (por ejemplo, SNAIL, ZEB y factores de transcripción de TWIST) .^{38,39} Creemos que esto eventos da a las células neoplásicas una capacidad intrínseca de resistir la QRTn, aunque, los mecanismos subyacentes no están claros, esta es una línea de investigación futura de potencial trascendencia.

Finalmente, en nuestro análisis multivariante también se identificó la presencia de adenoma residual adyacente al tumor como factores pronósticos independientes asociados con RPC. Este hallazgo está -en nuestra opinión- asociado a tumores de grado bajo (G1-G2), ya que en nuestra serie el 48,6% de los casos con pCR tuvieron un adenoma en la biopsia pre-

tratamiento y el 45,8% de los tumores en nuestra serie fueron grado 1 -2. Además, sólo dos casos con adenocarcinomas de grado 3 presentaron un adenoma adyacente al carcinoma. Esta asociación podría explicar la buena respuesta de los tumores que albergan un adenoma "residual".

Finalmente, otro aspecto evaluado por nuestro estudio fue el infiltrado inflamatorio, que no demostró asociación independiente con RPC. Este parámetro es muy difícil de evaluar, debido a la complejidad de la respuesta celular en la invasión tumoral. Se necesitan estudios más complejos específicamente diseñados para explorar esta respuesta.

Las principales limitaciones de nuestro estudio son su naturaleza retrospectiva y la reproducibilidad interobservador de la gemación tumoral, no explorada en nuestra institución ni en la literatura en general. La evaluación de la expresión de proteínas MMR también es una fuente potencial de sesgo, ya que algunas veces, la reacción inmunohistoquímica heterogénea de las proteínas es difícil de interpretar. Sin embargo, la técnica está estandarizada en nuestro centro y validada por un laboratorio externo, la evaluación consensuada de la reacción y la evaluación en preparaciones histológicas completas de tejido disminuyó este sesgo.

En conclusión, a pesar de la extensa investigación, los mecanismos moleculares y genéticos para la sensibilidad a la quimioterapia y la radioterapia de las células del adenocarcinoma rectal aún están por definirse claramente. La variada respuesta a la QRTn observada entre los tumores sugiere una relación compleja entre la biología tumoral y la RPC, es probable que una serie de vías genéticas o moleculares regulen la quimioradiosensibilidad. La acción clave que podría resolver las inconsistencias sería coordinar estudios multicéntricos para crear cohortes mucho más grandes y asegurar plataformas metodológicas robustas que prueben las modalidades de imagen, perfiles de expresión génica, combinadas con estándares acordados

de revisión histopatológica e inmunohistoquímica como la gemación tumoral y un sistema dMMR.

8. Referencias

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al.: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65(2):87-108 Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:1731-40.
2. Kalady M, de Campos-Lobato L, Stocchi L, Geisler D, Dietz D, Lavery I, et al. Predictor factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Ann Surg*. 2009;250:582-9.
3. Yeo S, Kim D, Kim T, Chang H, Oh J, Park W, et al. Pathologic complete response of primary tumor following preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: long-term outcomes and prognostic significance of pathological nodal status (KROG 09-01). *Ann Surg*. 2010;252:998-1004.
4. Fleming F, Pahlman L, Monson J. Neoadjuvant therapy in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2011;54:901-12.
5. Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, Pazdur R, Dubrow R, Cleary KR, et al. Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: the MD Anderson Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999;44:1027-38.
6. Smith FM, Waldron D, Winter DC. Rectum-conserving surgery in the era of chemoradiotherapy. *Br J Surg* 2010;97:1752-64.
7. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Kepka L, Winkler-Spytkowska B, Suwinski R, et al. Polish Colorectal Study Group. Prediction of mesorectal nodal metastases after chemoradiation for rectal cancer: results of a randomized trial: implication for subsequent local excision. *Radiother Oncol*. 2005;76:234-40.
8. García-Aguilar J, Hernández de Anda E, Sirivongs P, Lee SH, Madoff RD, Rothenberg DA. A pathologic complete response to preoperative chemoradiation is associated with lower local recurrence and improved survival in rectal cancer patients treated by mesorectal excision. *Dis Colon Rectum* 2003;46:298-304.
9. Quirke P, Steele R, Monson J, et al. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet*. 2009;373(9666):821-8.
10. Lino-Silva LS, Molina-Frías E, Salcedo-Hernández RA, Herrera-Gómez A, Padilla-Rosciano A. Relevance of an adequate pathologic evaluation of radical rectal resection specimens. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2013;43:198-205.
11. Lino-Silva LS, García-Gómez MA, Aguilar-Romero JM, et al. Mesorectal pathologic assessment in two grades predicts accurately recurrence, positive circumferential margin, and correlates with survival. *J Surg Oncol*. 2015;112(8):900-6.
12. Kim NM, Hur H. New Perspectives on Predictive Biomarkers of Tumor Response and Their Clinical Application in Preoperative Chemoradiation Therapy for Rectal Cancer. *Yonsei Med J* 2015;56(6):1461-77
13. García-Flórez LJ, Gómez-Álvarez G, Frunza AM, Barneo-Serra L, Martínez-Alonso C, Fresno-Forcelledo MF. Predictive markers of response to neoadjuvant therapy in rectal cancer. *J Surg Res*. 2015;194(1):120-6.
14. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:e128
15. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 2009;76(1):1-18.
16. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual, 7th ed. Chicago IL: Springer, Inc;2010: 123-9
17. Nowak JA, Hornick JL. Molecular Evaluation of Colorectal Adenocarcinoma: Current Practice and Emerging Concepts. *Surg Pathol Clin*. 2016;9(3):427-39.
18. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology* 2017;30(9):1299-1311.

19. Garland ML, Vather R, Bunkley N, Pearse M, Bissett IP. Clinical tumour size and nodal status predict pathologic complete response following neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2014; 29: 301–7.
20. Qiu HZ, Wu B, Xiao Y, Lin GL. Combination of differentiation and T stage can predict unresponsiveness to neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Colorectal Dis* 2011; 13:1353–60.
21. Huh JW, Kim HR, Kim YJ. Clinical prediction of pathological complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2013; 56:698–703.
22. Kalady MF, de Campos-Lobato LF, Stocchi L et al. Predictive factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Ann Surg* 2009; 250: 582–9.
23. Hur H, Kim NK, Yun M et al. 18Fluoro-deoxy-glucose positron emission tomography in assessing tumor response to preoperative chemoradiation therapy for locally advanced rectal cancer. *J Surg Oncol* 2011; 103: 17–24.
24. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
25. Yoon YS, Yu CS, Kim TW, et al. Mismatch repair status in sporadic colorectal cancer: immunohistochemistry and microsatellite instability analyses. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26:1733–1739.
26. Kim HR, Kim HC, Yun HR, et al. An alternative pathway in colorectal carcinogenesis based on the mismatch repair system and p53 expression in Korean patients with sporadic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:4031–4040.
27. Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, et al., North Central Cancer Treatment G. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol.* 2004;22:1572–1582.
28. Huh JW, Kim HC, Kim SH et al. Mismatch Repair Gene Expression as a Predictor of Tumor Responses in Patients With Rectal Cancer Treated With Preoperative Chemoradiation. *Medicine* 2016;95(3):e2582.
29. De la Rosa N, Rodriguez-Bigas MA, Chang GJ et al. DNA Mismatch Repair Deficiency in Rectal Cancer: Benchmarking Its Impact on Prognosis, Neoadjuvant Response Prediction, and Clinical Cancer Genetics. *J Clin Oncol* 2016; 34:3039-46.
30. Brouquet A, Mortenson MM, Vauthey JN, et al: Surgical strategies for synchronous colorectal liver metastases in 156 consecutive patients: Classic, combined or reverse strategy? *J Am Coll Surg* 210: 934-941, 2010.
31. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor 'budding' in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993;36: 627–635
32. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2008;51: 568–572.
33. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Vieth M, Langner C. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19: 3706–3712.
34. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H (2002) Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well-differentiated colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 45: 628–634.
35. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012;106: 1713–1717.
36. Zlobec I, Lugli A, Baker K, Roth S, Minoo P, Hayashi S, Terracciano L, Jass JR. Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J Pathol* 2007;212: 260–268
37. Bhanu A, Wood G, Mirnezami A, Darzi A, Tekkis P, Goldin R. Epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer: seminal role in promoting disease progression and resistance to neoadjuvant therapy. *Surg Oncol* 2012;21: 316–323.
38. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009;19: 156–172.
39. Dawson H, Lugli A. Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Front Med (Lausanne)* 2005;2: 11.