

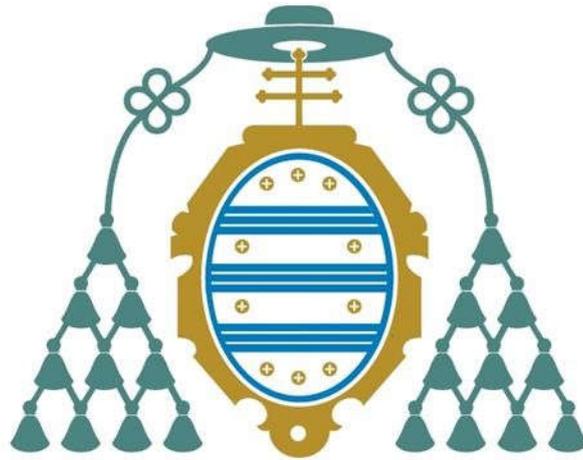
Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

**ESTUDIO HISTOMOLECULAR DE UN MODELO DE METÁSTASIS DE
ADENOCARCINOMA DE COLON A HÍGADO**

ADELA ALONSO FERNÁNDEZ-VELASCO

Tesis doctoral 2020



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

**ESTUDIO HISTOMOLECULAR DE UN MODELO DE METÁSTASIS DE
ADENOCARCINOMA DE COLON A HÍGADO**

ADELA ALONSO FERNÁNDEZ-VELASCO

Tesis doctoral 2020



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Estudio histomolecular de un modelo de metástasis de adenocarcinoma de colon a hígado	Inglés: Histomolecular study of a metastatic adenocarcinoma model from colon to the liver
2.- Autor	
Nombre: Adela Alonso Fernández-Velasco	DNI/Pasaporte/NIE: _____
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCIÓN. El cáncer de colon constituye actualmente uno de los cánceres más frecuentemente diagnosticados en los países desarrollados, siendo en España el más frecuente en ambos sexos. La supervivencia ha aumentado en las últimas décadas, fundamentalmente debido a una detección precoz gracias a los programas de cribado y consecuentemente un tratamiento también más temprano. Sin embargo, casi la mitad de los pacientes que lo padecen fallecen por la enfermedad. El hígado es uno de los principales órganos donde el cáncer de colon metastatiza. Así, entre el 10 y el 25% de los pacientes que son operados de cáncer de colon sufren finalmente metástasis hepáticas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. Teniendo en cuenta que la mayoría de los enfermos de adenocarcinoma de colon fallecen por sus metástasis, hemos considerado pertinente conocer en profundidad este tipo de tejido tumoral. Así, pretendemos analizar parámetros clínico-patológicos y moleculares en un modelo de metástasis de adenocarcinoma de colon y sus metástasis hepáticas con el fin de compararlos en busca de similitudes y/o diferencias con relevancia pronóstica. Entre las principales moléculas a estudiar destacan las principales proteínas de transición epitelio-mesénquima (β -catenina, E-cadherina, CD-138, Desmina, Vimentina, actina) y moléculas con relevancia pronóstica demostrada tales como FAK, COX-2, SATB2, STAT6, C-MET, SOX-9 Y MUC5.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se seleccionaron 52 pacientes con resección quirúrgica del adenocarcinoma de colon y de su posterior metástasis hepática durante el periodo 2007-2017, previa aprobación por el comité de ética del hospital (nº 163/17). Se construyeron matrices tisulares y se realizó una base de datos incluyendo parámetros demográficos, supervivencias, datos histológicos y moleculares. El resultado inmunohistoquímico se valoró según un Score de 0 a 300 tras multiplicar la intensidad (0-3) por la extensión (0-100%) del inmunomarcaje. Se realizó un análisis estadístico de los resultados utilizando el programa SPSSv23 estableciendo el valor de significación en $p < 0.05$.

RESULTADOS. Al comparar los parámetros histológicos entre ambos tejidos (primario vs metástasis) cabe destacar que la necrosis intratumoral fue significativamente mayor en las metástasis ($p < 0,05$) sin identificar diferencias entre el grado tumoral ni la actividad proliferativa. La actividad mitótica del tumor primario se correlacionó positivamente con la supervivencia global ($r = 0,347$), la supervivencia libre de enfermedad ($r = 0,512$) y la supervivencia post-metástasis ($r = 0,824$). Además, la presencia de yemas tumorales se relacionó con una supervivencia libre de enfermedad más baja ($p = 0,013$; $31,4 \pm 7,9$ vs $9,8 \pm 2,3$ meses). Entre los principales datos moleculares observados cabe destacar una subexpresión significativa de E-cadherina, β -catenina y SATB2 en las metástasis ($295,9 \pm 15,5$ vs $249,8 \pm 18,7$; $p < 0,001$; $255,1 \pm 71,4$ vs $190,0 \pm 72,1$; $p < 0,001$; y $175,3$ vs $125,0$; $p = 0,009$ respectivamente) y una sobreexpresión significativa de COX2 y C-MET en los tumores metastásicos ($67,5$ vs $40,16$; $p = 0,019$; y $35,03$ vs $15,44$; $p = 0,07$ respectivamente); y una sobreexpresión de MUC5AC en los tumores primarios respecto a las metástasis ($26,77$ vs $5,77$; $p = 0,045$). No se identificó diferencias estadísticamente significativas en la expresión de sindecano-1, FAK ni de STAT6.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

No se identificó expresión de ningún marcador mesenquimal. Una expresión de β -catenina \leq 150 puntos en las metástasis y una expresión negativa de COX2 en los primarios seleccionaron significativamente un grupo de paciente con peor pronóstico. Por el contrario, los casos con más de 150 puntos de inmunexpresión de SATB2 en tumores primarios revelaron un grupo de pacientes con mejor supervivencia global, mejor tiempo libre de enfermedad y mejor supervivencia postmetástasis. Se identificaron otros puntos de corte inmunohistoquímico de interés para FAK, SOX9, MUC5 y C-MET que se relacionaron con aspectos histológicos de los tumores entre los que cabe destacar una expresión de FAK \geq 250 puntos en el tumor primario y la presencia de tumor buds ($p < 0,05$).

CONCLUSIÓN. Se han identificado diferencias histológicas y moleculares significativas entre los adenocarcinomas de colon y sus respectivas metástasis para los parámetros y proteínas analizadas, observando además importantes correlaciones de interés clínico-patológico. Finalmente hemos identificado puntos de corte inmunohistoquímico para algunas de las proteínas estudiadas que segregan a los pacientes por grupos de supervivencia otorgando al estudio un alto valor práctico desde el punto de vista anatómopatológico y oncológico.

RESUMEN (en Inglés)

INTRODUCTION: Currently colon cancer is one of the most frequently diagnosed cancers in developed countries, being in Spain the most common in both sexes. Although survival rates have increased in recent decades - mainly due to early detection through screening programs resulting in earlier treatment - almost half of the patients who are diagnosed with the disease die as a result. Since the liver is one of the main organs where colon cancer metastasizes, due to this tendency, 10% to 25% of all patients who receive colon cancer surgery eventually suffer from liver metastases.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES: Bearing in mind that most patients with colon adenocarcinomas die as a result of it metastasizing, the comprehensive study of this type of tumour tissue was deemed pertinent and necessary. For this reason, the comparison of the clinical-pathological and molecular parameters between colon adenocarcinoma metastasis models and their corresponding liver metastasis was carried out in order to detect the similarities and differences with prognostic relevance. Among the main molecules that were studied were the main epithelium-mesenchyme transition proteins (β -catenin, E-cadherin, CD-138, Desmine, Vimentin, actin) and molecules with proven prognostic relevance such as FAK, COX-2, SATB2, STAT6, C-MET, SOX-9 and MUC5.

MATERIAL AND METHODS: Following the approval by the hospital's ethics committee (No. 163/17), a selection of 52 patients who had received colon adenocarcinoma resection surgery and had developed subsequent liver metastasis during the period 2007-2017 was made. Tissue matrices were constructed and a database was created including demographic parameters, survival rates, histological and molecular data. An immunohistochemical score between 0 to 300 was assigned after multiplying the intensity (0-3) by the extension (0-100%) of the immunomarking. A statistical analysis of the results was then performed using the SPSSv23 program setting the significance value at $p < 0.05$.

RESULTS: Upon comparison of the histological parameters between both tissues (primary vs. metastasis), it should be noted that a significantly higher intratumoral necrosis was observed in the metastases ($p < 0.05$) although no differences in the tumour grade or the proliferative activity were detected. The mitotic activity of the primary tumour was found to be positively correlated with overall survival ($r = 0,347$), disease-free survival ($r = 0,512$) and post-metastasis survival ($r = 0,824$). Furthermore, a relation between the presence of tumour buds and lower disease-free survival ($p = 0,013$; $31,4 \pm 7,9$ vs $9,8 \pm 2,3$ months) was also found. Among the main molecular data, a significant under-expression of E-cadherin, β -catenin and SATB2 in the metastases ($295,9 \pm 15,5$ vs $249,8 \pm 18,7$; $p < 0,001$; $255,1 \pm 71,4$ vs $190,0 \pm 72,1$; $p < 0,001$; and $175,3$ vs $125,0$; $p = 0,009$ respectively), a significant overexpression of COX2 and C-MET in metastatic tumors ($67,5$ vs $40,16$; $p = 0,019$; and $35,03$ vs $15,44$; $p = 0,07$ respectively); and an overexpression of MUC5AC in primary tumours in relation to metastases ($26,77$ vs $5,77$; $p = 0,045$) was observed. No statistically significant differences were identified in the expression of syndecane-1, FAK and



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

STAT6. No expression of any mesenchymal marker was identified. An expression of β -catenin \leq 150 points in metastases and a negative expression of COX2 in the primary tumours highlighted a group of patients with a significantly worse prognosis. In contrast, cases with more than 150 SATB2 immunopositive points in primary tumours revealed a group of patients with better overall survival, better disease-free time and better postmetastasis survival. Other immunohistochemical cut-off points of interest for FAK, SOX9, MUC5 and C-MET relating to histological aspects of the tumours were identified, including a FAK expression of \geq 250 points in the primary tumour and the presence of tumour buds ($p < 0,05$).

CONCLUSION: Significant histological and molecular differences between colon adenocarcinomas and their respective metastases with regards to the analysed parameters and proteins have been identified, with important clinical-pathological correlations also being observed. Lastly, immunohistochemical cut-off points for some of the studied proteins that segregate patients by survival groups have been identified thus giving the study a high practical value from an anatomopathological and oncological point of view.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN Oviedo**

AGRADECIMIENTOS

Aunque esta página suponga la última que escribo del documento de mi tesis doctoral y que suele ser la primera en fondo y forma para el lector, es para mí de vital importancia reconocer que no podría haber llegado hasta aquí sin todas las personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, y muy especialmente, deseo expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Iván Fernández-Vega, mi director de tesis. No creo que pudiera haber tenido otro mejor. Nunca podré agradecerle suficientemente todo lo que me ha enseñado científicamente hablando a lo largo de la residencia que estoy a punto de terminar y especialmente en el proceso de elaboración de esta tesis doctoral. He trabajado mucho y muy duro, pero sé que no lo podría haber hecho sin su total dedicación e implicación en este trabajo. Le estoy profundamente agradecida y lo estaré siempre por todo esto, por sus consejos y ánimos en los momentos más difíciles y también, y no menos importante, por las innumerables horas que ha dedicado a revisar y corregir este trabajo.

Quiero también agradecer al Dr. Luis Manuel Quirós Fernández, codirector de mi tesis, por su asesoramiento, amabilidad, implicación y apoyo a lo largo de este camino. Ha sido determinante en varias tomas de decisiones fundamentales para el devenir de la tesis.

Al personal de laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica del HUCA y muy especialmente a Aitana Vallina, a la que le tengo un cariño especial, y a Daniela Corte. Dos personas y profesionales estupendas sin las cuales este trabajo no se podría haber realizado. Tampoco sé cómo agradecerse. También muy agradecida a Mar y Jose, compañeros y amigos que siempre están ahí para cualquier cosa y no ha sido menos con la tesis, a Rocío y a Begoña.

A mis padres, sin los cuales me da la sensación que habría conseguido pocas cosas en la vida y desde luego nunca habría podido llegar hasta aquí. Por su apoyo incondicional y en cualquier momento y sus palabras de ánimo constantes. Tampoco les estaré nunca suficientemente agradecida.

A mi novio, Nick, por su ayuda también incondicional y por su respaldo y su habilidad para sacarme siempre una sonrisa en los momentos más difíciles. También profundamente agradecida.

A toda mi familia. A todos mis tíos y primos, que, en mayor o menor medida, han sido partícipes del trabajo científico que he realizado y especialmente a mi tío Carlos y también a mi tío Antonio y a mis primos María, Cecilia, Valeria, Telma y Jose, por su interés y apoyo a lo largo de este tiempo. También a mi recién fallecida Abuela Chus, que, a sus casi 92 años, me preguntaba siempre que iba a verla cada semana cómo iba con la tesis. Ojalá vea desde el cielo cómo por fin

está hecho. Me hubiera encantado que lo viera por lo mucho que la quería y por lo que sé que ella me quería a mí.

A mis compañeros de residencia, a Imran, mi co-residente y gran amigo, por su apoyo siempre incondicional y también a Susy, Lisseth, Mónica, Auxi, Juan Carlos y Lara. Es imposible tener mejores compañeros y amigos. No puedo más que agradecerles de corazón sus palabras de ánimo en los momentos más complicados y su comprensión y apoyo en todo momento. También muchas gracias a Diego por sus ánimos constantes y también a David, Jorge y Víctor.

A la Dra. Aurora Astudillo González, por transmitirme su vocación y entusiasmo por cada cosa que hace en el trabajo y en la ciencia en general y por su apoyo para llegar hasta aquí. Muy agradecida.

A mis compañeros adjuntos el Dr. Jose Ramón Riera, la Dra. Carmen González del Rey y Verónica Blanco Lorenzo por su interés, apoyo y comprensión a lo largo de este difícil camino. Es de agradecer.

A mí ya ex-adjunto y gran amigo Carlos, al que no he parado de echar de menos en el HUCA desde que se fue en junio de 2018. Siempre ha sido un apoyo constante.

A todos mis amigos, que, como siempre, me han apoyado en todo momento y muy especialmente a Bea, Lu, María y Mori, por su apoyo e interés en este largo camino. También a mis amigas de Salamanca y de manera muy especial, a Pau, Mari y María, por su apoyo y ánimos incondicionales.

Espero no olvidarme de nadie. Pero en definitiva gracias a todos aquellos que lo han hecho un poco más fácil y llevadero y han tenido en algún momento unas palabras de ánimo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
INTRODUCCIÓN	9
1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER.....	10
2 BREVE EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER	13
3 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER DE COLON.....	15
EPIDEMIOLOGÍA	15
FACTORES DE RIESGO.....	17
PREVENCIÓN PRIMARIA. HÁBITOS DE VIDA SALUDABLES.....	18
PREVENCIÓN SECUNDARIA. PROGRAMAS DE SCREENING.....	19
ESTADIO TUMORAL	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	24
1 HIPÓTESIS.....	25
2 OBJETIVOS	26
OBJETIVOS GENERALES	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1 SELECCIÓN DE PACIENTES.....	28
2 VARIABLES CLÍNICAS	28
3 VARIABLES HISTOLÓGICAS	29
4 ESTADIFICACIÓN.....	30
5 MATRIZ DE TEJIDOS (“TISSUE ARRAY”).....	30
6 INMUNOHISTOQUÍMICA	30
7 CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES.....	32
8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
9 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	32
CAPÍTULO I.....	33
1 INTRODUCCIÓN	34
CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DEL COLON	34
CARÁCTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL COLON	35
TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER DE COLON	37
GRADO HISTOLÓGICO.....	38
TUMOR BUDDING	39
VÍAS DE DISEMINACIÓN O METÁSTASIS.....	40

2	RESULTADOS.....	44
	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y VARIABLES CLÍNICAS.....	44
	VARIABLES HISTOLÓGICAS	45
	CORRELACIONES CLÍNICO PATOLÓGICAS DE INTERÉS	46
	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	47
3	DISCUSIÓN	50
CAPÍTULO II		55
1	INTRODUCCIÓN	56
	CONCEPTO DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA	56
	MOLÉCULAS EPITELIALES.....	61
	E-CADHERINA.....	61
	β-CATENINA	62
	CD138 (SINDECANO-1)	64
	MOLÉCULAS MESENQUIMALES	65
	VIMENTINA	65
	DESMINA.....	67
	ACTINA MÚSCULO LISO.....	68
2	RESULTADOS.....	70
	ANÁLISIS DE LOS MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO – MESÉNQUIMA.....	70
	ESTUDIOS DE CORRELACIÓN ESTADÍSTICA	72
	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIAS.....	74
3	DISCUSIÓN	74
	MOLÉCULAS EPITELIALES.....	74
	MOLÉCULAS MESENQUIMALES	77
CAPÍTULO III		78
1	INTRODUCCIÓN	79
	QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL	79
	STAT6.....	80
1.3	COX-2	81
	SATB2.....	83
	MUC5AC	84
	C-MET	86
1.7	SOX9.....	87
2	RESULTADOS.....	89
	EXPRESIÓN DE QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL	92
	EXPRESIÓN DE STAT6.....	95
	EXPRESIÓN DE COX-2.....	97

	EXPRESIÓN DE SATB2	99
	EXPRESIÓN DE MUC5AC.....	100
	EXPRESIÓN DE C-MET	101
	EXPRESIÓN DE SOX9.....	103
3	DISCUSIÓN	103
3.1	FAK.....	103
3.2	STAT6.....	105
3.3	COX-2	106
3.4	SATB2.....	107
3.5	MUC5AC.....	109
3.6	C-MET	110
3.7	SOX9.....	111
	CONCLUSIONES	113
1	CONCLUSIONES	114
	BIBLIOGRAFÍA.....	115
1	BIBLIOGRAFÍA.....	116
	ANEXOS.....	123
1	ANEXOS.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales características del cáncer.....	11
Figura 2. Mapa mundial de la epidemiología del cáncer.....	13
Figura 3. Tasas de incidencia del cáncer de colon por región, edad y sexo	15
Figura 4. Estadio tumoral del CCR.....	22
Figura 5. Representación esquemática macro y microscópica de los tejidos a estudiar.....	25
Figura 6. Diferentes zonas anatómicas del colon.....	34
Figura 7. Características histológicas y citológicas del colon.....	36
Figura 8. Cáncer de colon. Pieza macroscópica e imagen histológica	38
Figura 9. Proceso gráfico de las dos principales vías de diseminación metastásica, linfática y hematogena	40
Figura 10. Características histológicas de los tumores primarios y metastásicos.	46
Figura 11. Análisis de supervivencia para diferentes parámetros histopatológicos.	49
Figura 12. Estado transición epitelio-mesénquima para metástasis linfáticas y hematogenas. ..	56
Figura 13. Representación que demuestra que las células tumorales de los vasos linfáticos peritumorales son de fenotipo epitelial.....	57
Figura 14. Inmunohistoquímica para E-cadherina en el cáncer de mama.....	61
Figura 15. Inmunohistoquímica para E-cadherina en diferentes tejidos sanos y tumorales.....	62
Figura 16. Inmunohistoquímica para β -catenina en el cáncer de colon.	63
Figura 17. Inmunohistoquímica del SDC1 en adenomas colorrectales avanzados	65
Figura 18. Inmunohistoquímica para CD138 en células plasmáticas normales y tumorales	65
Figura 19. Inmunohistoquímica para vimentina en adenocarcinomas de colon.....	66
Figura 20. Inmunohistoquímica para vimentina en tumores malignos.	67
Figura 21. Inmunohistoquímica para desmina en adenocarcinomas de colon.	68
Figura 22. Inmunohistoquímica para actina de músculo liso tumores malignos.....	69
Figura 23. Expresión inmunohistoquímica de los marcadores epiteliales.....	71
Figura 24. Expresión inmunohistoquímica de los marcadores mesenquimales.	72
Figura 25. Análisis de supervivencia para β -catenina.	74
Figura 26. Inmunoexpresión de FAK.....	80
Figura 27. Inmunoexpresión de STAT6 en adenocarcinomas de colon.....	81
Figura 28. Inmunoexpresión de STAT 6 en tumor fibroso solitario	81
Figura 29. Inmunoexpresión de COX-2 en colon.	83
Figura 30. Inmunoexpresión de STAB2 en adenocarcinomas de colon.....	83
Figura 31. Inmunoexpresión de MUC5AC en colon.	85
Figura 32. Inmunoexpresión de MUC5AC en adenocarcinoma de páncreas.....	85
Figura 33. Inmunoexpresión de C-MET en tumores malignos.	86
Figura 34. Inmunoexpresión de SOX9 en adenocarcinomas de colon.....	88
Figura 35. Imagen de inmunohistoquímica para FAK y aspectos histopatológicos de un adenocarcinoma primario de colon.	93
Figura 36. Imagen de inmunohistoquímica para FAK en los tumores primarios y en sus metástasis.	94
Figura 37. Imagen de inmunohistoquímica para STAT6 en los tumores primarios y en sus metástasis.	95
Figura 38. Análisis de supervivencia para STAT6.....	96
Figura 39. Imagen de inmunohistoquímica para COX-2 en los tumores primarios y en sus metástasis.	97
Figura 40. Análisis de supervivencia para COX-2.....	98
Figura 41. Imagen de inmunohistoquímica para SATB2 en los tumores primarios y en sus metástasis.	99

Figura 42. Análisis de supervivencia para SATB2. 99
Figura 43. Imagen de inmunohistoquímica para MUC5AC, C-MET, SOX9 en los tumores primarios y en sus metástasis. 101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tumor primario (pT).	20
Tabla 2. Niveles de infiltración de los Ganglios linfáticos regionales en el CCR (pN)	21
Tabla 3. Descripción de los tipos de metástasis a distancia del CCR.....	22
Tabla 4. Anticuerpos utilizados y sus características y preparación.....	31
Tabla 5. Características epidemiológicas y de supervivencia de los 52 casos incluidos en el estudio.	44
Tabla 6. Principales características histopatológicas de los tumores a estudio.	45
Tabla 7. Análisis de las correlaciones entre variables clínico-patológicasde interés del estudio	47
Tabla 8. Análisis de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas estudiadas de EMT...	70
Tabla 9. Análisis de la correlación entre variables moleculares.....	73
Tabla 10. Análisis de la correlación entre variables clínicas, patológicas y moleculares.....	73
Tabla 11. Análisis de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas estudiadas	89
Tabla 12. Análisis de la correlación entre variables moleculares.....	90
Tabla 13. Análisis de la correlación entre variables moleculares.....	90
Tabla 14. Análisis de la correlación entre variables clínicas, patológicas y moleculares.....	92
Tabla 15. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con FAK en tumores primarios y metástasis.	93
Tabla 16. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con STAT6 en tumores primarios y metástasis	96
Tabla 17. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con COX-2 en tumores primarios y metástasis	98
Tabla 18. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con SATB2 en tumores primarios y metástasis	100
Tabla 19. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con MUC5AC en tumores primarios y metástasis.	101
Tabla 20. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con C-MET en tumores primarios y metástasis	102
Tabla 21. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con SOX9 en tumores primarios y metástasis	103

ABREVIATURAS

ACA: Adenoma colorrectal avanzado

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AML: Actina de músculo liso

ARN: Ácido ribonucleico

CAP: College of American Pathologists

CAP: College of American Pathologists

CCHNP: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico

CCR: Carcinoma colorrectal

CGA: Campos de gran aumento

CHC: Carcinoma hepatocelular

COX: Ciclooxygenasa

CSC: Célula madre cancerígena

EMT: Epithelial-mesenchymal transition (Transición epitelio-mesénquima)

FAK: Quinasa de adhesión focal

H&E/HEE: Hematoxilina-Eosina

HGF: Factor de crecimiento hepatocelular

HR: Hazard Ratio

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC: Intervalo de confianza

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleucina

LCC: Left-sided colon cancer (carcinoma de colon izquierdo)

MC: Carcinoma mucinoso

MMR: DNA mismatch repair

MSS: Microsatélites estables

PAF: Poliposis adenomatosa familiar

RCC: Right-sided colon cancer (carcinoma de colon derecho)

RTK: receptor tirosin quinasa

SG: Supervivencia global

SGCC: Colorectal signet ring cell carcinoma

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SNC: Sistema nervioso central

SPM: Supervivencia postmetástasis

TB: *Tumor buds*

TFS: Tumor fibroso solitario

TILs: Linfocitos intratumorales

TLE: Tiempo libre de enfermedad

TMA: Tissue microarrays

TNM: Tumor Node Metastasis

UICC: Union for International Cancer Control

WHO: World Health Organization

INTRODUCCIÓN



1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

Las innumerables células que forman el cuerpo de los seres humanos, parece que entre 10 y 100 billones, con la capacidad de dividirse entre 50 y 60 veces antes de morir, conforman diferentes tejidos que a su vez forman los órganos que componen nuestro cuerpo, como el tracto intestinal, el aparato genitourinario, la mama, los pulmones o la piel entre otros (Xu, Li, & Stohr, 2013)

Los tumores o neoplasias pueden ser benignos o malignos. Un tumor es benigno cuando sus características microscópicas y macroscópicas son relativamente inocentes, lo que implica que se mantendrá localizado, que no puede diseminarse a otras localizaciones y que generalmente es susceptible de extirpación quirúrgica total, si bien puede ocasionar síntomas importantes por compresión, producir una masa no localizada y, en ocasiones, ser responsables de una enfermedad grave. Un tumor maligno, o cáncer, puede por el contrario invadir y destruir las estructuras adyacentes y diseminarse a otras localizaciones distantes y distantes (metastatizar). En definitiva, los tumores se clasifican en benignos o malignos en función de su capacidad de invasión y de metástasis, siendo estos últimos los que suelen causar la muerte del individuo y por tanto en los que se centrará nuestro trabajo. En términos numéricos, según la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estimó 18.1 millones de nuevos casos de tumores malignos en el mundo con 9.6 millones de muertes para el año 2018 (Bray *et al.*, 2018).

Todos los tumores tienen dos componentes básicos (Figura 1):

1) Células neoplásicas clonales que constituyen su parénquima. En el caso de los tumores malignos son aquellas que han adquirido capacidades oncogénicas y comienzan a dividirse sin control. Las capacidades oncogénicas del cáncer es lo que se conoce en inglés como “the hallmarks of cancer” y son las capacidades funcionales que adquieren las células neoplásicas de los tumores malignos que les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse. Estas funciones las adquieren diferentes tipos tumorales mediante distintos mecanismos y en momentos diversos durante el curso de la carcinogénesis (Figura 1A). Esto es posible gracias a dos características fundamentales: la primera, el desarrollo de inestabilidad genética en las células tumorales y la segunda, el estado inflamatorio de las lesiones premalignas y las claramente malignas que depende de células del sistema inmune, algunas de las cuales favorecen la progresión tumoral de distintas maneras (Hanahan & Weinberg, 2011). Así, la evasión de las células tumorales del ataque de las células del sistema inmune pone de relieve el doble papel de nuestras células de defensa que a la vez son bloqueadas, favoreciendo el desarrollo del tumor. Esta es una de las más conocidas capacidades oncogénicas emergentes, cuyos avances científicos fueron premiados con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 2018.

2) Estroma reactivo, formado principalmente por tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, macrófagos y linfocitos en cantidades variables (Figura 1B). Las células neoplásicas determinan el comportamiento y las consecuencias patológicas del tumor, pero a su vez su desarrollo y evolución depende en gran medida del estroma que lo sustenta. La irrigación sanguínea de los vasos del estroma y el tejido conjuntivo del mismo son fundamentales para que las células tumorales se mantengan vivas y se dividan. Por tanto, la interacción entre las células tumorales y las estromales tiene un papel clave en la propia biología de los tumores y, en el caso de los tumores malignos, dicha interacción da lugar a fenotipos cada vez más agresivos, lo que favorece su crecimiento, invasión y diseminación metastásica. Posteriormente, se pueden producir nuevas diseminaciones metastásicas o segundas olas de metástasis desde las iniciales. Por otra parte, el estroma determina también la consistencia de las neoplasias. Así, si el estroma de soporte es escaso, la neoplasia es blanda y carnosa al tacto. En cambio, cuando las células parenquimatosas estimulan la formación de un abundante estroma colágeno, lo que se conoce como desmoplasia, los tumores son duros o pétreos. Sin embargo, son las células neoplásicas en las que se basa la nomenclatura de los tumores (Pietras & Ostman, 2010).

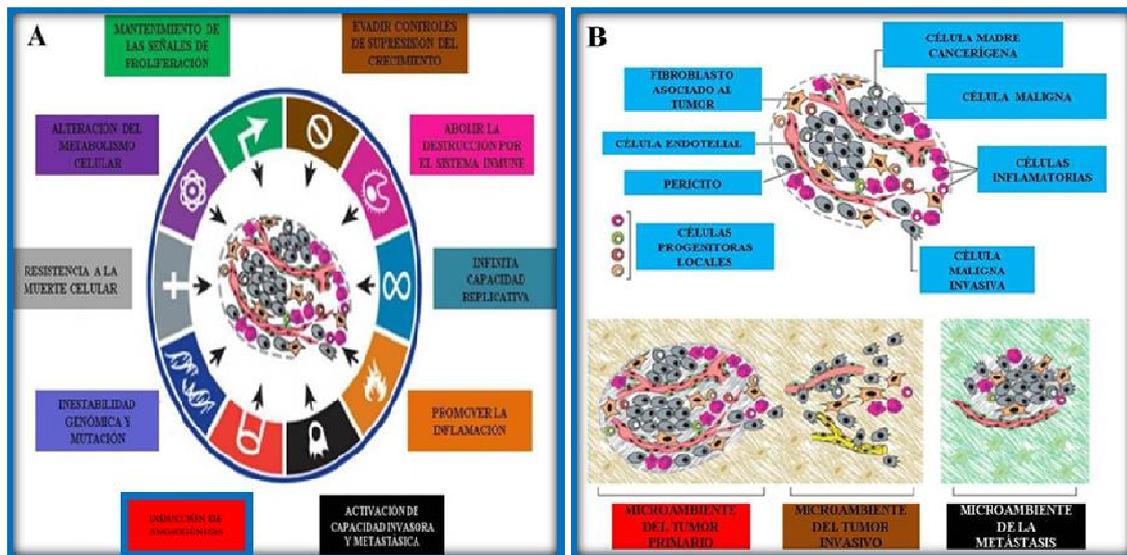


Figura 1. Principales características del cáncer. A) Principales características de las células malignas. B) El microambiente tumoral. Modificado de (Hanahan & Weinberg, 2011).

A lo largo de la historia natural de los tumores malignos existen al menos tres procesos fundamentales implicados que facilitan su progresión:

- 1) Angiogénesis. Es la formación de vasos sanguíneos por el tumor, proporcionándole los nutrientes que necesita para crecer (Carmeliet & Jain, 2000).
- 2) Invasión local. Los tumores benignos crecen normalmente como masas expansivas que permanecen en su lugar de origen y no tienen la capacidad de infiltrar localmente o a distancia

como hacen los tumores malignos. A veces desarrollan una cápsula fibrosa que los separa de los tejidos circundantes. Por el contrario, el crecimiento de los tumores malignos o cánceres se acompaña de infiltración, invasión y destrucción progresiva del tejido circundante. Después del desarrollo de metástasis, la invasividad es la característica más fiable que diferencia los tumores benignos de los malignos (Folkman, 2002).

- 3) Metástasis. También conocido como enfermedad diseminada o a distancia, es la propagación de un tumor maligno en un lugar distinto de aquel en el que se originó primeramente. La presencia de metástasis califica a un tumor automáticamente y fuera de toda duda como maligno ya que las neoplasias benignas no tienen dicha capacidad. Aunque existen algunas excepciones, todos los tumores malignos pueden metastatizar. Así, existen al menos tres vías de diseminación metastásica: siembra directa de las cavidades y superficies corporales, diseminación linfática y diseminación hematógena, siendo, en líneas generales, la segunda la vía fundamental de diseminación para los carcinomas o tumores epiteliales malignos y la tercera la vía preferida de los sarcomas o tumores mesenquimales malignos (Padera *et al.*, 2002). No obstante, aunque la diseminación hematógena sea típica de los sarcomas, se observa también en muchos carcinomas. Los pulmones y el hígado son los órganos más frecuentemente afectados por esta vía, porque el drenaje de las venas cavas fluye hacia los pulmones y el del área portal hacia el hígado. Así, el hígado es el órgano al que más frecuentemente metastatiza el cáncer de colon y es en este patrón de metástasis el eje fundamental del que se derivan los principales objetivos de este trabajo (Enquist *et al.*, 2014).

El concepto de las capacidades oncogénicas del cáncer ha proporcionado un marco conceptual útil para entender la compleja biología del cáncer y han demostrado ser componentes integrales de la mayoría de las formas de cáncer. En los próximos años se esperan avances significativos que afecten a procesos clave como la invasión tumoral o las metástasis, con grupos de investigación centrados en el desarrollo de nuevas y prometedoras dianas terapéuticas (Oberndorfer & Mullauer, 2018). En este sentido, es llamativo el cada vez mayor armamento de fármacos específicos que se pueden clasificar en función de su efecto en una o más de las capacidades oncogénicas del cáncer. Además, la eficacia de estas drogas representa una validación de cada capacidad oncogénica particular: si una de estas es realmente importante para la biología de los tumores, entonces su inhibición debería afectar y limitar el crecimiento tumoral y su progresión (Ruoslahti, Bhatia, & Sailor, 2010).

2 BREVE EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

Las enfermedades no transmisibles son a día de hoy responsables de la mayoría de las muertes en el mundo y se espera que el cáncer sea la mayor causa de mortalidad en todos los países del planeta Tierra en el siglo XXI. Según la OMS, en el año 2015 el cáncer fue la primera causa de muerte por debajo de los 70 años en hasta 48 países, la mayoría correspondientes al mundo desarrollado (Figura 2).

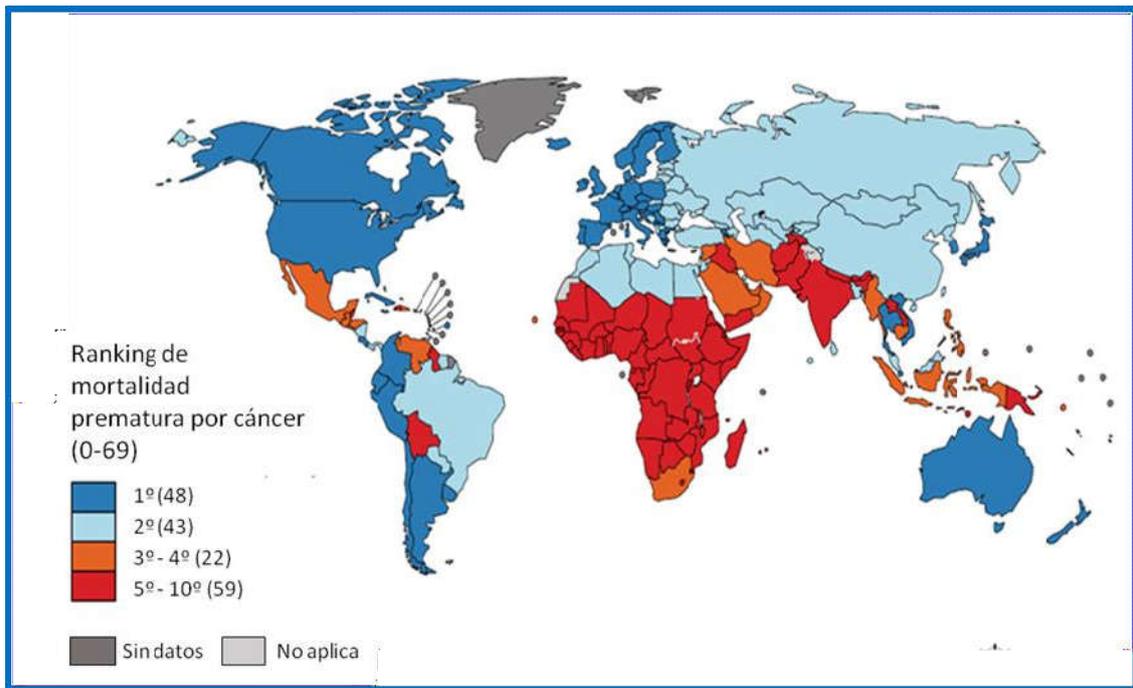


Figura 2. Mapa mundial de la epidemiología del cáncer. Se representa el ranking por países del cáncer como causa de muerte por debajo de los 70 años (modificado de Bray et al., 2018).

La incidencia del cáncer y su repercusión dentro de la mortalidad global está creciendo a un ritmo acelerado. Las causas son especialmente complejas, aunque se debe fundamentalmente al crecimiento de la población y al aumento de su esperanza de vida, así como a determinados factores de riesgo que se asocian con el desarrollo socioeconómico, a destacar el sedentarismo, dietas hiperproteicas, escasa actividad física etc. En muchos países en vías de desarrollo y con economías emergentes se está observando un aumento de cánceres típicos de los países más desarrollados (los asociados a la *occidentalización* del estilo de vida) en detrimento de los típicamente asociados a la pobreza y a infecciones. Esto refleja que aún hay diferencias geográficas por países e incluso entre diferentes regiones según el nivel de desarrollo socioeconómico. Así, son evidentes las diferencias en la incidencia de cánceres asociados a infecciones, como los de cérvix, estómago o de hígado, y que están muy presentes en países en desarrollo, a diferencia de los tumores de mama o colon que claramente predominan en los países

desarrollados (Bray & Soerjomataram, 2015; Omran, 1971). Finalmente, otras de las razones que pueden explicar la mayor tasa de mortalidad global por cáncer es también por un descenso en las tasas de mortalidad por otras enfermedades como por ejemplo las enfermedades cardiovasculares (Global Burden of Disease Cancer *et al.*, 2018).

En cuanto a la incidencia y mortalidad por continentes, casi la mitad de los nuevos casos y un poco más de la mitad de las muertes por cáncer ocurrieron en Asia en el año 2018, también en parte porque casi el 60% de la población vive allí. El 23.4% del total de cánceres se dieron en Europa y el 20.3% de todas las muertes, a pesar de que sólo representa un 9% de la población. En América la incidencia fue del 21% y la tasa de mortalidad del 14.4% del total. Otro dato interesante es que de manera diferente a lo que ocurre en otras regiones, las tasas de mortalidad en Asia y África son mayores a las tasas de incidencia (Bray *et al.*, 2018; Jemal *et al.*, 2011)

De manera global, los 10 cánceres más frecuentes suponen hasta un 65% de todos los casos nuevos y de muertes por cáncer. En referencia a la epidemiología mundial por tipos de cáncer para ambos sexos, el de pulmón es el más frecuentemente diagnosticado (11.6%) y el de mayor tasa de mortalidad (18.4% del total de muertes por cáncer), seguido de cerca por el cáncer de mama (11.6%), cáncer colorrectal (CCR)(10.2%) y cáncer de próstata (7.1%) en incidencias y por el CCR (9.2%), de estómago (8.2%) y de hígado (8.2%) en tasas de mortalidad (Bray *et al.*, 2018; Jemal *et al.*, 2018).

3 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER DE COLON EPIDEMIOLOGÍA

Incidencia

El CCR es uno de los cánceres más frecuentes en el mundo occidental, habiéndose diagnosticado algo más de 1.8 millones de casos nuevos en 2018 y suponiendo aproximadamente 1 de cada 10 casos nuevos de cáncer (Bray *et al.*, 2018). Es el tercero en incidencia en el mundo (en ambos sexos y en varones, y el segundo en mujeres) y las tasas de incidencia son 3 veces mayores en los países desarrollados que en los no desarrollados o aquellos en vías de desarrollo, siendo considerada a dicha enfermedad como un marcador de desarrollo socioeconómico (Fidler, Soerjomataram, & Bray, 2016). Los países con mayor incidencia están en Europa (Hungria, Eslovenia, Eslovaquia y Noruega), en zonas de Australia y Nueva Zelanda, países de Norte América y el Sureste Asiático, siendo Hungría y Noruega los primeros entre hombres y mujeres, respectivamente (Figura 3). En Uruguay, la incidencia en ambos sexos también es elevada (Arnold *et al.*, 2017).

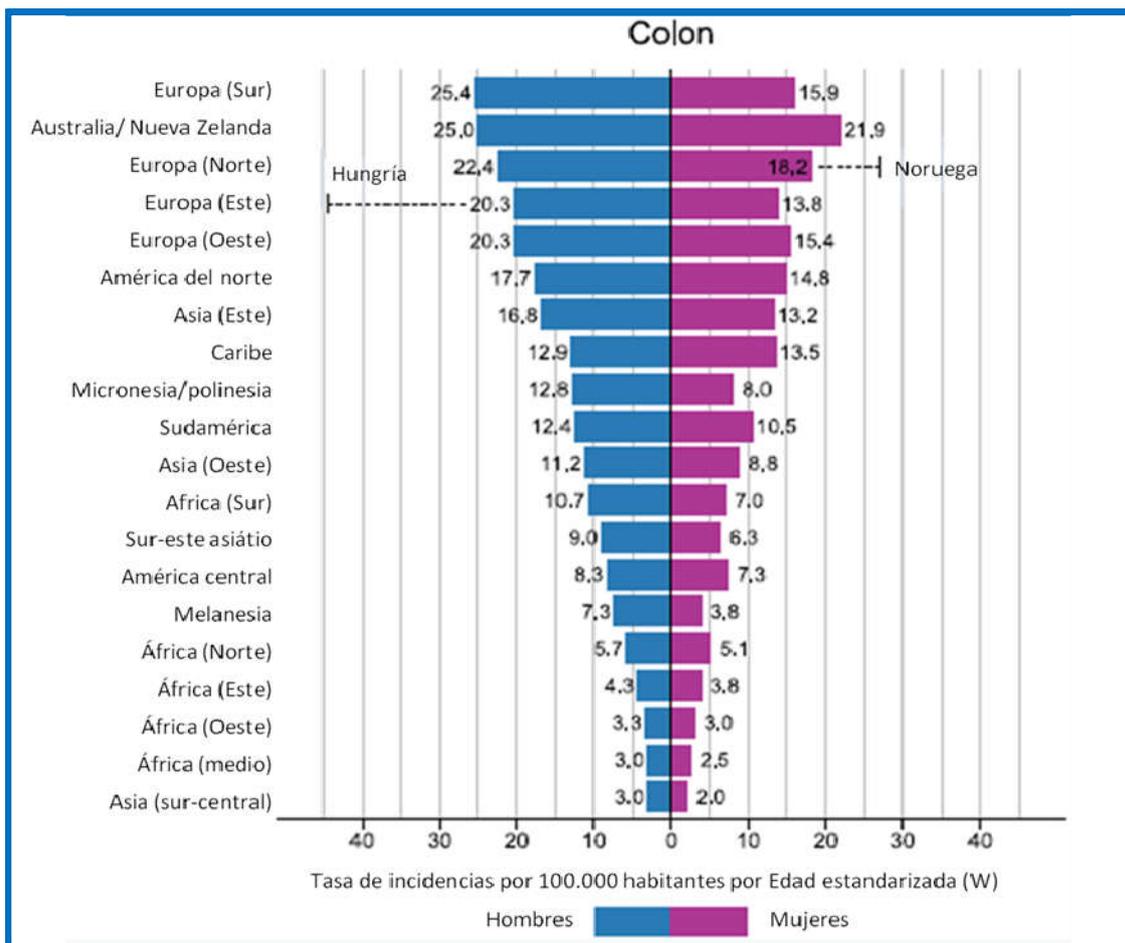


Figura 3. Tasas de incidencia del cáncer de colon por región, edad y sexo. (modificado de Bray *et al.*, 2018).

En España, el CCR es el más frecuente en ambos sexos, con 34331 casos diagnosticados en el año 2017, siendo las tasas más altas en Andalucía y Cataluña. En mujeres, es el segundo en incidencia por detrás del cáncer mama y en hombres el segundo por detrás del de próstata(Galceran *et al.*, 2017)

A nivel autonómico, en el Principado de Asturias, según datos publicados por la Consejería de Salud, los datos son similares a los publicados a nivel nacional, siendo el de mayor frecuencia para ambos sexos y el segundo en incidencia tanto en hombres como en mujeres sólo por detrás del cáncer de próstata y mama, respectivamente. Se diagnostican unos 1100 casos al año en la región que suponen aproximadamente el 16% de los diagnósticos de cáncer, porcentaje similar al nacional(Obtenido de *astursalud*, diciembre 2018)(Galceran *et al.*, 2017).

Mortalidad

Durante el año 2018 se han producido cerca de 900000 muertes por CCR, lo que supone, igual que en términos de incidencia, 1 de cada 10 muertes por cáncer. Es el segundo cáncer con más alta tasa de mortalidad por detrás del cáncer de pulmón. A pesar de ser la incidencia el triple en los países desarrollados respecto a los no desarrollados, no hay esta diferencia en cuanto a la mortalidad, pues los casos mortales son considerablemente mayores en los países con menor desarrollo(Arnold *et al.*, 2017).

A nivel nacional, el cáncer de colon se encuentra también en segunda posición en cuanto a la mortalidad, por detrás del cáncer de pulmón, con casi 16000 muertes al año. Sin embargo, si tenemos en consideración el incremento en la incidencia, la mortalidad no aumentó en la misma medida, casi con toda seguridad debido a la detección precoz gracias a los programas de cribado y los consecuentes tratamientos en etapas más tempranas(Lopez-Abente *et al.*, 2010; Schreuders *et al.*, 2015)

En el Principado de Asturias, según la Consejería de Salud, mueren cada año unas 350 personas por esta enfermedad, lo que supone aproximadamente el 10% de todas las muertes por cáncer (Obtenido de *astursalud*, diciembre 2018).

Supervivencia y pronóstico

La supervivencia y pronóstico del cáncer de colon están muy relacionados con el estadio patológico de la enfermedad, que incluye la identificación del grado de invasión y el estado ganglionar, así como la presencia o no de metástasis a distancia. Según la *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* la tasa de supervivencia general a 5 años es del 64% aproximadamente. En el caso de los cánceres en estadio localizado la tasa de supervivencia es del 90%. Si se ha diseminado hacia los ganglios linfáticos regionales sería del 71% a los 5 años. Si existen metástasis a distancia es de en torno al 14% en el mismo período de tiempo. En los tumores de colon malignos diseminados se está consiguiendo aumentar la mediana de supervivencia a más de 2 años gracias a una terapéutica mejorada. Así, muchos pacientes con enfermedad avanzada de inicio y tratamiento neoadyuvante con quimioterapia, pueden llegar a ser candidatos a tratamiento quirúrgico, tanto del tumor primario, como de las metástasis (White *et al.*, 2017).

FACTORES DE RIESGO

Existen numerosos factores predisponentes para el cáncer de colon que merecen una especial atención:

- 1) La edad. Supone el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Como sucede en otros muchos cánceres, el 90% de los casos se dan en pacientes mayores de 50 años. Así, cualquier persona por encima de esta edad y sin ningún otro factor predisponente, es considerado como de riesgo medio y candidato a someterse a un programa de cribado (Pal & Hurria, 2010; Rizvi, Raza, & Mahdi, 2014).
- 2) Sexo. Los hombres tienen un riesgo ligeramente aumentado de desarrollar CCR así como una supervivencia a largo plazo peor y las mujeres lo desarrollan con más frecuencia en el colon derecho que en el izquierdo (Quirt, Nanji, Wei, Flemming, & Booth, 2017)
- 3) Antecedentes familiares de CCR. Existe un riesgo mayor en aquellos pacientes que tienen antecedentes familiares de la enfermedad, especialmente si el familiar es de primer grado. Asimismo, el riesgo es mucho mayor si la edad al diagnóstico del familiar es menor de 60 años (Wilkinson *et al.*, 2019)
- 4) Síndromes o enfermedades hereditarias: Poliposis adenomatosa familiar (PAF), Síndrome de Gardner y Síndrome de Turcot (John Gásdal Karstensen, 2019); Síndrome de Lynch o Síndrome del cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) (Carethers & Stoffel, 2015) con su variante fenotípica el Síndrome de Muir – Torre (Burriss *et al.*, 2019; Le *et al.*, 2017; Ponti, Manfredini, Tomasi, & Pellacani, 2016); Poliposis asociada al gen MYH (Hegde *et al.*, 2014); Poliposis infantojuvenil; Poliposis de Peutz-Jeghers (Meserve & Nucci, 2016).

- 5) Enfermedad inflamatoria intestinal: Enfermedad de Crohn(Carchman, 2019)y colitis ulcerosa(Keller, Windsor, Cohen, & Chand, 2019; Lopez, Pouillon, Beaugerie, Danese, & Peyrin-Biroulet, 2018).El riesgo aumenta a los 8-10 años de evolución de la colitis.
- 6) Cáncer de colon previo o pólipos predisponentes (adenomatosos). Los pólipos neoplásicos (adenomatosos, vellosos y túbulo-vellosos) tienen riesgo de degeneración maligna, pudiendo presentarse con displasia de bajo o alto grado. Los programas de cribado permiten evitar su progresión a cáncer al extirparlos durante una colonoscopia(Sandler *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2019).
- 7) Factores dietéticos. La dieta rica en grasas (carnes rojas, procesadas...) se ha asociado a un aumento del riesgo, así como la dieta pobre en fibras, verduras, calcio o vitamina D. (Zhao *et al.*, 2017).
- 8) Otros: A destacar el tabaco (Durko & Malecka-Panas, 2014), la inactividad física y la obesidad habitualmente derivada(Iyengar, Gucalp, Dannenberg, & Hudis, 2016), el consumo de alcohol(Vanella, Archibugi, Stigliano, & Capurso, 2019) etc.

PREVENCIÓN PRIMARIA. HÁBITOS DE VIDA SALUDABLES

Según la OMS, la prevención primaria de cualquier enfermedad es aquella que evita la aparición de dicho padecimiento, a través de medidas como la vacunación, el control de la exposición a factores ambientales o la adquisición de determinados hábitos de vida. Se destacan las siguientes medidas para prevenir el CCR(Durko & Malecka-Panas, 2014):

- Dieta rica en fibra, vitaminas B y probióticos
- Consumo limitado de carne roja
- Consumo de alcohol con moderación
- No fumar
- Evitar la obesidad
- Realizar ejercicio físico regular

También es de especial relevancia el consejo genético. El CCHNP o síndrome de Lynch y la PAF están entre los principales síndromes de cáncer hereditario. Los pacientes con estos síndromes y sus familiares deben ser remitidos a las unidades de CCR hereditario para su valoración y en caso de detectarse la mutación realizar las medidas preventivas oportunas para los pacientes de alto riesgo (Balaguer, 2014)

PREVENCIÓN SECUNDARIA. PROGRAMAS DE SCREENING

El objetivo de la prevención secundaria es detectar la enfermedad cuando ya está establecida pero en sus estadios precoces, cuando es aún asintomática y evitar su progresión. En el CCR, como sucede en otros como la mama o el cérvix, existen programas de cribado poblacionales. Éstos consisten, para las personas de riesgo medio (>50 años sin antecedentes personales ni familiares de interés), en la realización de la prueba de sangre oculta en heces cada dos años y si ésta es positiva, una colonoscopia completa. Para las personas de riesgo alto (determinados casos de cánceres familiares o síndromes familiares) se recomienda realizar una colonoscopia completa y la periodicidad depende de la causa que produce el aumento del riesgo. Hay autores que proponen que comenzar el cribado a los 45 años podría tener un beneficio sustancial para los pacientes y, por tanto, reducir la mortalidad por CCR(Mannucci *et al.*, 2019).

ESTADIO TUMORAL

El estadio de cualquier cáncer se refiere a la extensión de la enfermedad, es decir, la etapa en la que se encuentra dentro de su historia natural. La clasificación del cáncer en estadios es esencial para su división en diferentes grupos pronósticos y consecuentemente para su tratamiento. De hecho, la extensión anatómica de la enfermedad es el factor pronóstico más importante en el CCRy en la mayoría de los cánceres. Por lo tanto, del informe anatomopatológico de la pieza quirúrgica se obtiene la mejor información pronóstica. Aunque el protocolo del Colegio Americano de Patólogos (CAP) para el informe patológico del CCR no impide el uso de otros sistemas de estadiaje, el protocolo recomienda realizar éste según el sistema TNM de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* y de *International Union Against Cancer (UICC)*(*AJCC Cancer Staging Manual*, 2017).

Por consenso de la AJCC y la UICC, "T" se refiere a un tumor primario que no ha sido tratado anteriormente. "p" hace referencia a la clasificación patológica del TNM, basada en los hallazgos macro y microscópicos, que es diferente a la clasificación clínica. De manera análoga, pN y pM se refieren a la clasificación patológica en cuanto a ganglios linfáticos afectados y presencia o no de metástasis a distancia. La clasificación clínica del TNM, cTNM, la realiza el médico clínico previamente al tratamiento quirúrgico en un estudio inicial del paciente o cuando no es posible realizar la clasificación patológica, pero es ésta última la que tiene una importancia crucial para el pronóstico y posterior tratamiento del paciente (Chapuis, Chan, & Dent, 2011).

Clasificación patológica del cáncer colon pTNM. (8ª edición AJCC)

A continuación y de forma resumida se procede a detallar el TNM para el CCR desde el punto de vista anatomopatológico.

En la tabla 1 se describen los principales niveles de infiltración del tumor en la pared del colon.

Tabla 1. Tumor primario (pT).

pTX	El tumor no se puede evaluar
pT0	No hay evidencia de tumor primario
pTis	Carcinoma in situ, carcinoma intramucoso (afectación de la lámina propia sin atravesar la muscularis mucosa)
pT1	El tumor invade la submucosa (a través de la muscularis mucosa pero no llega a la muscular propia)
pT2	El tumor invade la muscular propia
pT3	El tumor atraviesa la muscular propia y afecta los tejidos pericorrectales
pT4	
• pT4a	El tumor invade el peritoneo visceral (incluyendo perforación macroscópica del colon por el tumor e invasión continua del tumor a través de áreas de inflamación a la superficie del peritoneo visceral)
• pT4b	El tumor invade directamente o se adhiere a la superficie de otros órganos o estructuras adyacentes

En la tabla 2 se describen los principales niveles de infiltración de ganglios linfáticos locorregionales por el CCR.

Tabla 2. Niveles de infiltración de los Ganglios linfáticos regionales en el CCR (pN).

NX	No se pueden evaluar ganglios linfáticos
N0	No existen metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales
• N1a	Metástasis en 1 ganglio linfático regional
• N1b	Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales
• N1c	No hay ganglios linfáticos positivos pero hay depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o tejidos no peritonealizados pericólicos o perirrectales/mesorrectales
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos
• N2a	Metástasis en 4 a 6 ganglios linfáticos
• N2b	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos

En cuanto al estadiaje de los ganglios linfáticos regionales es importante tener en cuenta que es necesario aislar un mínimo de 12 ganglios para considerarlo adecuado en aquellas piezas quirúrgicas con intención curativa (Cserni, Vinh-Hung, & Burzykowski, 2002); que el número de ganglios aislados se ha asociado a un mejor pronóstico, probablemente debido a un estadiaje más certero (G. J. Chang, Rodriguez-Bigas, Skibber, & Moyer, 2007); que las metástasis a ganglios linfáticos no regionales fuera del área de drenaje del tumor deben considerarse M1a; y que los depósitos tumorales N1c son pequeños nódulos tumorales de cualquier forma o tamaño sin tejido linfoide asociado, estructuras vasculares ni estructuras nerviosas en el área de drenaje linfático del carcinoma primario y que se asocian a un pronóstico muy malo. N1c se utiliza sólo cuando no hay tejido linfoide asociado, el número de depósitos tumorales no se añade al número de ganglios linfáticos si éstos existen (Lo, Pollett, Siu, Gallinger, & Burkes, 2008; Puppa *et al.*, 2007).

En la tabla 3 se describen los principales niveles de metástasis del CCR.

Tabla 3. Descripción de los tipos de metástasis a distancia del CCR.

M0	No hay evidencia de metástasis a distancia por imagen, no hay evidencia de tumor en otros órganos o estructuras. Esta categoría no la asignan los patólogos
M1	Metástasis a distancia
• M1a	Metástasis localizadas en 1 solo órgano o sitio anatómico sin metástasis peritoneales
• M1b	Metástasis en 2 o más órganos o sitios anatómicos sin metástasis peritoneales
• M1c	Metástasis en la superficie peritoneal (sola o junto con metástasis en otros órganos)

M=Metástasis a distancia

Basándose en este sistema TNM, finalmente los pacientes con CCR se les clasifica en función del estadio tumoral (Figura 4).

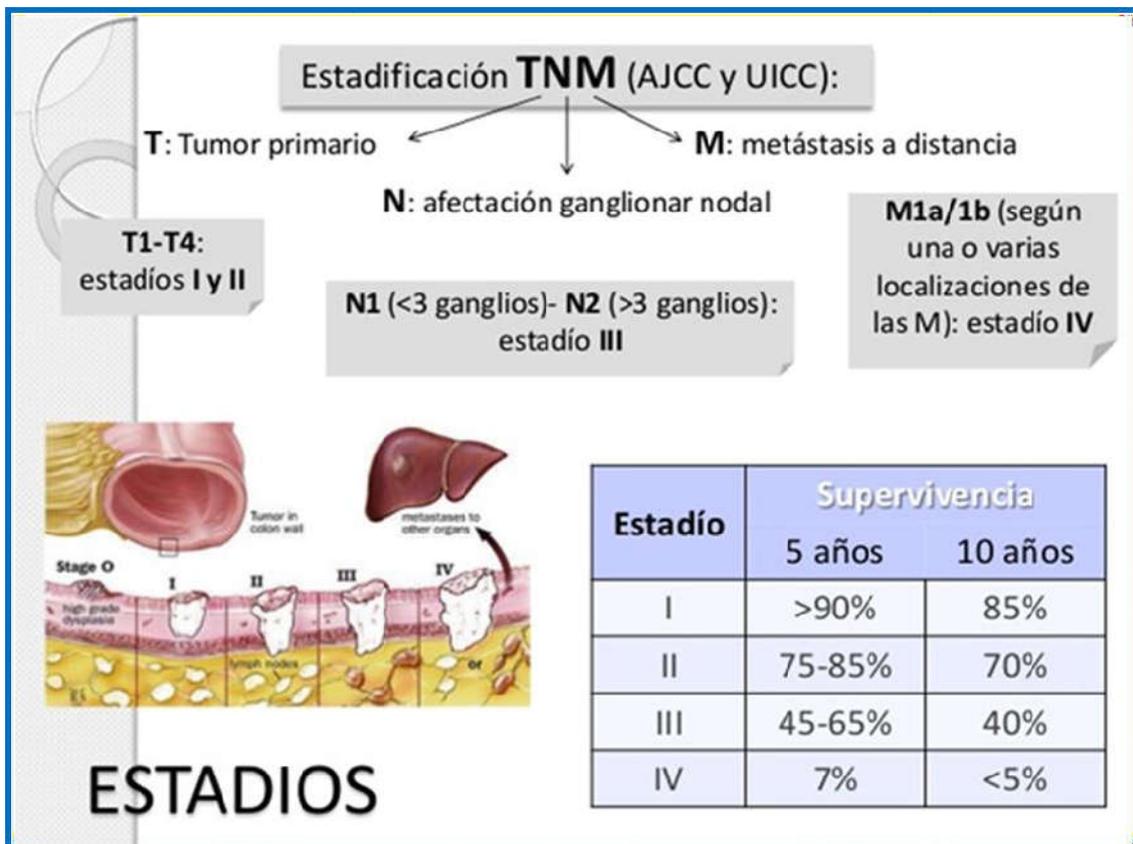
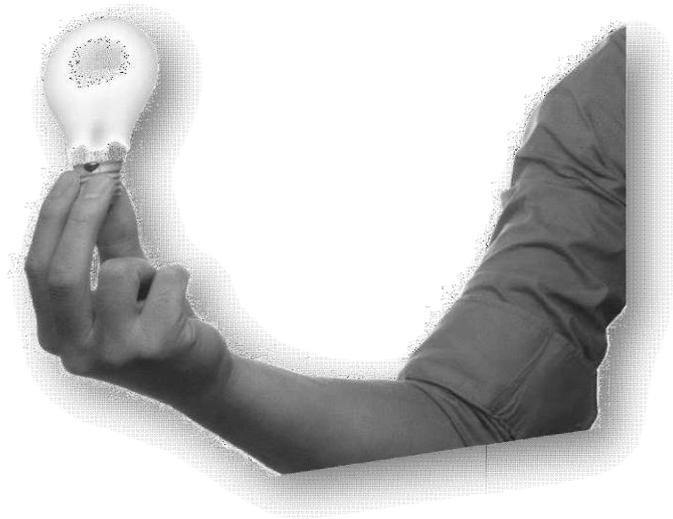


Figura 4. Estadio tumoral del CCR.

Una de las mayores novedades de la 8ª edición del estadiaje del CCR según la AJCC es la introducción de una serie de factores predictivos y pronósticos no anatómicos con un nivel de evidencia I-II basados en histopatología y biología molecular(Yao, Wu, & Liu, 2017). De entre ellos cabe destacar el nivel de regresión tumoral post-tratamiento, la afectación del margen circunferencial, la invasión linfática y/o perineural, la presencia de inestabilidad de microsatélites y mutaciones como las de KRAS/NRAS y/o BRAF. Estos factores pueden ser o no en su totalidad competencia del patólogo. En cualquier caso, en el contexto actual de la medicina personalizada, una combinación entre el estadio anatómico con aspectos moleculares específicos del tumor puede ser muy importante para clasificar a los pacientes con una mayor precisión de cara a los tratamientos y a su pronóstico.

Finalmente, nuestro estudio se basa en el análisis histomolecular de un grupo específico de pacientes en una fase muy avanzada dentro de la historia natural del cáncer de colon. Así, este modelo estudia aspectos histopatológicos y moleculares de una serie de casos de adenocarcinomas de colon con muy alto potencial de malignidad, que habiendo recibido una terapéutica con intención curativa han desarrollado metástasis hepáticas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1 HIPÓTESIS

El CCR es uno de los tumores malignos más frecuentes en el mundo especialmente en los países desarrollados. Es un tumor que ha sido estudiado exhaustivamente en las últimas décadas, tanto desde el punto de vista clínico como desde una perspectiva histomorfológica y molecular. En este sentido, se han realizado importantes avances en el conocimiento del mismo. Sin embargo, las mejoras en las supervivencias han sido prácticamente gracias a un diagnóstico precoz. Por tanto, estadios avanzados siguen siendo letales para la mayor parte de los pacientes.

Son numerosos los trabajos que han estudiado diferentes parámetros clínicos y patológicos en el adenocarcinoma de colon, que es el tumor primario más frecuente, obteniendo datos con gran relevancia clínica en términos de supervivencia. Así, existen estudios previos en este tipo histológico de CCR que han identificado el comportamiento de moléculas como las de transición epitelio-mesénquima (B-catenina, E-cadherina, CD-138, Desmina, Vimentina, actina de músculo liso), la quinasa de adhesión focal FAK, así como de otras moléculas con alto significado pronóstico (COX-2, SATB2, STAT6, C-MET, SOX9 y MUC5AC).

Teniendo en cuenta que son los tumores primarios de colon los que habitualmente se operan y estudian, y que solamente en los últimos años se han empezado a operar las metástasis de los mismos, estamos ante la posibilidad de analizar y caracterizar el tejido diseminado de estos tumores, que es realmente el que permanece en el cuerpo y pone fin a la vida del paciente. Así, pretendemos estudiar parámetros clínico - patológicos y moleculares, especialmente proteínas que han tenido relevancia pronóstica probada y que además en su mayor parte están disponibles en los Servicios de Anatomía Patológica. Construiremos un modelo de metástasis compuesto por más de medio centenar de pacientes que han tenido un adenocarcinoma de colon y han desarrollado metástasis hepáticas a pesar de los tratamientos curativos (tumores de muy alto potencial de malignidad), realizando un estudio en ambos tipos de tejidos, el primario y la metástasis, con el fin de compararlos y con el afán de identificar similitudes y/o diferencias relevantes (Figura 5).

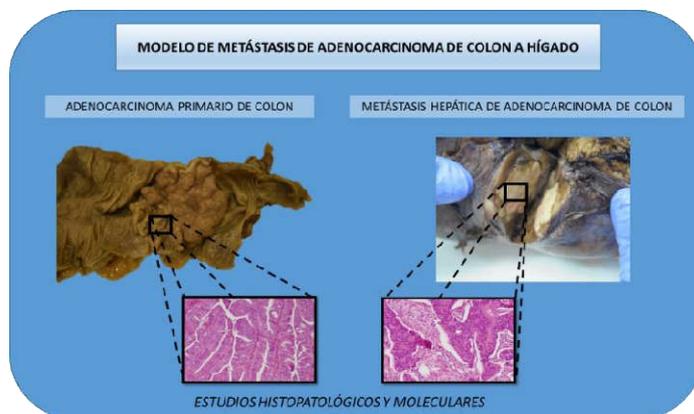


Figura 5. Representación esquemática macro y microscópica de los tejidos a estudiar.

2 OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Realizar un análisis comparativo de parámetros clínico-patológicos entre los adenocarcinomas primarios de colon y sus correspondientes metástasis hepáticas, así como estudiar la inmunexpresión diferencial de distintas moléculas (β -catenina, E-cadherina, CD-138, Desmina, Vimentina, AML, FAK, COX-2, SATB2, STAT6, C-MET, SOX9 Y MUC5AC) con el fin de identificar o establecer parámetros que pudieran tener relevancia clínico-patológica, especialmente de significado pronóstico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar una base de datos anonimizada con más de medio centenar de pacientes que han sufrido un adenocarcinoma de colon y sus correspondientes metástasis hepáticas y en ambos casos han sido operados en el HUCA.
2. Selección del tejido (revisión de laminillas de H&E y bloques de parafina).
3. Construcción de las matrices de tejido o *tissue arrays* compuestos por los adenocarcinomas primarios de colon y por sus metástasis hepáticas.
4. Análisis histopatológico y comparativo de los tumores primarios y de sus metástasis hepáticas.
5. Estudio inmunohistoquímico de moléculas de interés en las muestras tumorales (primarios y metástasis):
 - a. Moléculas de transición epitelio-mesénquima: β -catenina, E-cadherina, CD-138, Desmina, Vimentina, AML.
 - b. Quinasa de adhesión focal (FAK), COX-2, SATB2, STAT6, C-MET, SOX9, MUC5AC.
6. Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS



1 SELECCIÓN DE PACIENTES

Se realizó una búsqueda retrospectiva en PATWIN 4.2, programa de gestión de datos del Servicio de Anatomía Patológica, con el fin de identificar pacientes con diagnósticos de adenocarcinoma primario de colon y sus respectivas metástasis hepáticas durante los años 2007 y 2017. De los 117 registros obtenidos de pacientes, solamente 52 tenían pieza quirúrgica de ambas resecciones y material almacenado en el Servicio de Anatomía Patológica del HUCA. Se recogieron además variables clínicas de interés de cada paciente. Todos los diagnósticos fueron reevaluados usando muestras teñidas con hematoxilina y eosina conforme a los criterios de la *World Health Organization*. Para realizar el estudio se obtuvo la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) en noviembre de 2017 (nº163/17) (Anexo).

2 VARIABLES CLÍNICAS

Las variables clínicas estudiadas en los pacientes incluidos en el estudio son:

- Edad: aquella que presenta el paciente en el momento del diagnóstico de la metástasis hepática del CCR.
- Sexo: masculino o femenino.
- Localización: colon derecho, colon izquierdo (no se incluye recto).
- Diámetro máximo del tumor: medido en cm.
- Tasas de supervivencia: Supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia postmetástasis, medidas en meses.

1. Supervivencia global (SG): Periodo que transcurre desde la administración del tratamiento en estudio (cirugía de extirpación del tramo de intestino grueso que incluye el tumor) hasta el último control realizado o el fallecimiento del paciente.
2. Supervivencia libre de enfermedad (TLE): Tiempo que un paciente sobrevive sin signos de la enfermedad después del tratamiento del tumor primario.
3. Supervivencia postmetástasis (SPM): Tiempo que un paciente sobrevive desde la aparición de la metástasis.

3 VARIABLES HISTOLÓGICAS

En aquellos casos en los que se conservaron las laminillas con la tinción de H&E, el estudio de estas variables se realizó sobre esos cristales. Para el resto se realizó un corte a partir del bloque de parafina y una tinción estándar con H&E, sobre la cual se valoraron.

En los casos incluidos en nuestro estudio hemos estudiado las siguientes variables histológicas:

1. Tipo histológico. Confirmar que son todos adenocarcinomas
2. Necrosis: Este término hace referencia a un espectro de cambios morfológicos que siguen a la muerte celular en el tejido vivo, derivados en gran medida de la acción degradativa progresiva de las enzimas sobre la célula lesionada. Aunque hay diferentes tipos de necrosis, la que hemos valorado es la tumoral, es decir, la evidencia morfológica de la muerte de las células neoplásicas (Karsch-Bluman *et al.*, 2019).
3. Mitosis: Se estudió el número de mitosis por 10 campos de gran aumento (CGA). Para comparar esta variable con otras cualitativas del estudio, de manera arbitraria, la hemos segregado en dos grupos (<20 mitosis; >20 mitosis).
4. Grado de diferenciación. Caracterizado como bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado
5. Presencia o ausencia de yemas tumorales o *tumor buds*.

4 ESTADIFICACIÓN

La estadificación de los tumores se ha realizado según la 8ª clasificación de la AJCC. Todos los casos de nuestra base de datos seleccionada han sido pacientes en estadio IV, al tratarse de adenocarcinomas de colon metastásicos al hígado.

5 MATRIZ DE TEJIDOS (“TISSUE ARRAY”)

Todas las muestras en parafina empleadas procedieron del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias. Se seleccionaron regiones representativas de cada tumor para realizar la matriz de tejidos con tres muestras de cada caso, tanto de los adenocarcinomas primarios de colon como de sus metástasis hepáticas. Para ello, en la laminilla de H&E de cada tumor y de su correspondiente metástasis se marcaron las áreas morfológicamente más adecuadas. En el bloque parafinado de esa laminilla se toman 3 cilindros de 2 mm de material tumoral para la construcción de los tissue microarrays (TMAs), con muestras de tejido control sano de colon e hígado. Después de 5 minutos a 60°C los bloques fueron cortados a 4µm y preparados para las técnicas de inmunohistoquímica.

6 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la determinación de la expresión de cada una de las proteínas hemos seguido un proceso que está casi totalmente automatizado, en el que se utilizaron los equipos “Dako Autostainer PLus” y el “BenchMark ULTRA Staining System” (Ventana-Roche, Rotkreuz, Switzerland). La mayor parte de los anticuerpos utilizados en el estudio se están utilizando de rutina en el Servicio de Anatomía Patológica del HUCA.

Una vez realizados los cortes de los bloques de cada muestra, estos fueron desparafinados, hidratados y sometidos a desenmascaramiento antigénico en el módulo de pretratamiento PT-Link (Dako), cuyas condiciones para cada uno de los anticuerpos variaron en función de la proteína a estudio (Tabla 4). En el caso de los anticuerpos determinados en el autoStainer se usó el EnVision FLEX Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (DAKO, K8024). Cada uno de los anticuerpos fueron incubados tras bloquear la peroxidasa endógena con EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO, DM821) y posteriormente la señal fue detectada usando diaminobencidina como sustrato después de la incubación con Dako EnVision™ FLEX /HRP 20 minutos (DAKO, DM822). Se utilizó también un segundo equipo, el “BenchMark ULTRA Staining System” (Ventana-Roche, Rotkreuz, Switzerland) para el que los cortes de

tejidos fueron pretratados a 95°C durante 30 min e incubados con los siguientes anticuerpos primarios: C-MET :1 hora y 32 minutos; COX- 2: 32 minutos; SOX9: 32 minutos (“ready-to-use” Roche). Todos los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina 10 minutos (Envision™ Flex hematoxylin SM806). En el caso de los anticuerpos E-cadherina, CD-138, FAK, MUC-5AC, SATB-2, después de su incubación, se amplificó la señal de los mismos con Envision flex Mouse Linker (Dako SM804), durante 15 min, siendo el resto del protocolo igual para todos los anticuerpos. Una vez completado todo el proceso independientemente del equipo utilizado, los cortes de tejido fueron deshidratados y montados en medio de montaje permanente (Dako mounting medium, CS703), para posteriormente ser evaluados al microscopio. La visualización se llevó a cabo en un microscopio Olympus BX41 y se obtuvieron fotografías mediante una cámara Olympus DP71. Los controles negativos y positivos fueron procesados y evaluados en simultáneo (cada uno de ellos varió en función del anticuerpo).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados y sus características y preparación.

	Casa comercial	Referencia comercial	Clon	Desenmascaramiento	Incubación Primario	Control positivo
Actina músculo liso	Dako	IR611	1A4	20 min, 95°C, target retrieval solution high ph	20min	Apéndice
β-catenina	Dako	IR702	β-catenin	20 min, 95°C, target retrieval solution high ph	15min	Piel
C-MET	Roche	790-4430	Policlonal (conejo)	30 min, 95°C, CC1	1h 32min	Cáncer de pulmón
COX-2	Roche	760-4254	Policlonal (conejo)	30 min, 95°C, CC1	32min	Apéndice
E-cadherina	Dako	GA059	NCH-38	20 min, 95°C, target retrieval solution high ph	30min, linker 15min	Riñón
CD138	Dako	GA642	MI15	20 min 95°C, target retrieval solution high ph	20min, linker 15min	Amígdala
Desmina	Dako	IR606	D33	20 min 95°C, target retrieval solution high ph	20min	Apéndice
FAK	Millipore	05-537	4.47	20 min 95°C, target retrieval solution high ph	1/25, 20min, linker 15min	Carcinoma escamoso
MUC5AC	Dako	IR661	CLH2	20 min 95°C, target retrieval solution low ph	20min, linker 15min	Carcinoma gástrico
SATB2	Gennova	AP10597CL	EP281	20 min 95°C, target retrieval solution high ph	20min, linker 15min	Apéndice
STAT6	Santa Cruz	SC621	Policlonal (conejo)	20 min 95°C, target retrieval solution low ph	1/200, 20min,	Cáncer de pulmón
SOX9	Bio SB/ Roche	BSB3212	EP317	30 min 95°C CC1	32min	Carcinoma de colon
Vimentina	Dako	GA630	V9	20 min 95°C, target retrieval solution high ph	20min	Amígdala

7 CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES

Los niveles de expresión proteica fueron evaluados por dos observadores independientemente (y un tercero en caso de desacuerdo), teniendo en cuenta dos parámetros: la señal de intensidad inmunohistoquímica (en una escala de 0 a 3) y el porcentaje de células positivas (0-100). De las tres muestras de cada tumor determinadas la inmunotinción fue en general muy similar. Se realizó un Score global de 0 a 300 puntos como resultado de la multiplicación de ambos parámetros(Aviles-Salas *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2016; Igarashi, Teramoto, Ishida, Hanaoka, & Daigo, 2016; Ruschoff *et al.*, 2013).

8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas y moleculares en cada caso. Las variables cuantitativas se describieron mediante la media y la desviación típica. Para las variables cualitativas se realizó un análisis de frecuencias. Para el análisis estadístico inferencial de cada variable cuantitativa se realizó la prueba no paramétrica correspondiente cuando no se debe aplicar el test paramétrico de T de Student para comparar las medias entre muestras apareadas, interpretando al tejido tumoral metastático como la fase avanzada del tumor primario. Para identificar asociaciones entre variables cualitativas se realizó la prueba de Chi cuadrado. La correlación entre las variables cuantitativas fue valorada mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Para la estimación de la función de supervivencia se aplicó el test de Kaplan-Meier. Se realizó un análisis estadístico de los resultados utilizando el programa SPSSv23 y se aceptó como valor estadísticamente significativo una $p < 0,05$.

9 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este estudio presenta una serie de limitaciones:

1. Se trata de un estudio retrospectivo, con los posibles sesgos que acompañan este tipo de estudios.
2. El estudio se realiza en un único hospital.
3. El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo utilizando TMAs, si bien hay que señalar que se tomaron tres muestras representativas de cada tejido y que el patrón de expresión de las moléculas mayormente fue homogéneo.

CAPÍTULO I

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DEL MODELO DE METÁSTASIS DE ADENOCARCINOMA



1 INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DEL COLON

El colon o intestino grueso es la última parte del aparato digestivo, alcanzando una longitud aproximada de metro y medio y se extiende desde el final del intestino delgado (válvula ileocecal) hasta el ano. El diámetro va de entre 7.5 cm en la parte inicial a entre 4 y 2.5 cm en la parte distal. Se divide en diferentes partes anatómicas, con funciones ligeramente distintas: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente y recto (Figura 6). El colon ascendente y transverso absorben agua y electrolitos y el descendente y el recto almacenan productos fecales que posteriormente serán expulsados por el ano (Moran & Jackson, 1992).

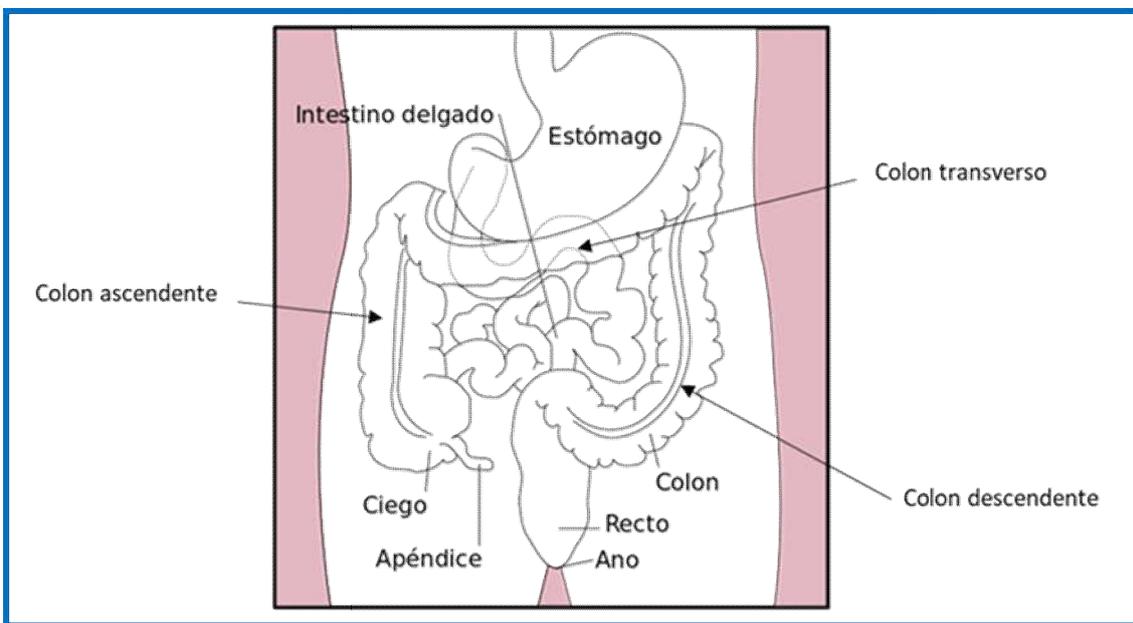


Figura 6. Diferentes zonas anatómicas del colon.

El colon derecho y el izquierdo presentan muchas diferencias no solo en cuanto a funciones fisiológicas sino también en cuanto a expresión génica, irrigación vascular, funciones metabólicas, inmunológicas, flora bacteriana o patrones de motilidad (Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2005; Kunzelmann & Mall, 2002; Mai & Morris, 2004)

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL COLON

El colon es una estructura tubular en cuya pared se pueden distinguir varias capas histológicas tales como la mucosa, la submucosa, la muscular propia y la serosa (Figura 7):

-La mucosa. Se divide histológicamente en tres capas, una superficial de revestimiento epitelial (epitelio cilíndrico simple o columnar), otra capa de tejido conectivo, la lámina propia y una capa fina de musculatura lisa o muscularis mucosae (muscular de la mucosa) que da lugar a pequeños movimientos y plegamientos de la mucosa y separa la lámina propia de la submucosa. El epitelio colónico, al igual que el estomacal o el del intestino delgado, se recambia continuamente en la superficie luminal y las células se reemplazan mediante procesos mitóticos en la base de las glándulas, cada seis o siete días. En el epitelio del colon existen fundamentalmente cuatro tipos de células: las células cilíndricas absorbentes, las caliciformes (en la base de las glándulas y en mayor cantidad que en el intestino delgado), células enteroendocrinas y células madre. El colon carece de células de Paneth, éstas se encuentran fundamentalmente entre el duodeno y el íleon (Vasquez *et al.*, 2016). La mucosa está formada por glándulas rectas, muy juntas entre sí, que poseen estos 4 tipos de células, siendo las principales las absorbentes y las caliciformes. Las glándulas son análogas a las criptas de Lieberkuhn del intestino delgado y este término se utiliza también para las glándulas del intestino grueso. Las células caliciformes, cuyos núcleos son pequeños y condensados, están mayoritarias en la base de las glándulas y, en cambio, la superficie luminal está totalmente revestida por células cilíndricas absorptivas, que presentan un núcleo grande ovoideo de localización basal. De manera análoga a la mayor capacidad absorptiva del colon derecho, es mayor la proporción en él de células absorptivas sobre las caliciformes y en el colon izquierdo la proporción, aunque sigue siendo mayor, se reduce. Los residuos orgánicos al pasar por el colon se van deshidratando por lo que el moco producido en mayor cantidad en el colon izquierdo tiene un papel importante como lubricante y facilita el paso de las heces (Vasquez *et al.*, 2016) (Naftalin, 1994). Aunque en mucha menor medida, en el epitelio colónico existen las llamadas células M, enterocitos especializados en la captación de antígenos luminales (Neutra, Frey, & Kraehenbuhl, 1996). La lámina propia ocupa los espacios entre las glándulas y proporciona una red linfática y vascular hacia la cual pasa el agua por un fenómeno de difusión pasiva. Además, en ella se encuentran nervios y el GALT o tejido linfoide asociado al intestino. El GALT se divide en GALT organizado, cuya principal función es inducir la respuesta inmunitaria intestinal y está formado por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer de la lámina propia y ganglios linfáticos mesentéricos; y el GALT difuso, efector de la respuesta inmunitaria y formado por linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia. El papel que desempeña el GALT es crucial para nuestro organismo, pues nuestro intestino está muy expuesto a antígenos de manera constante. Con esta organización se consigue una respuesta efectiva frente a patógenos y buena tolerancia a antígenos inofensivos. Se secretan antígenos tipo

IgA, que asimismo son un mecanismo de defensa en todas las mucosas del organismo (Ramiro-Puig, Perez-Cano, Castellote, Franch, & Castell, 2008).

-La submucosa es una capa de tejido conectivo laxo que sostiene la mucosa y en ella se encuentran grandes vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. En ella se encuentra el plexo mientérico de Meissner y las células intersticiales de Cajal, junto a células de músculo liso (Christensen & Rick, 1987)

-La muscular propia está formada por músculo liso que se divide a su vez en otras dos capas histológicas: la capa circular interna y la capa longitudinal externa. Entre ellas se encuentra el plexo mientérico o de Auerbach. La acción de ambas, que se colocan en ángulos perpendiculares entre sí, da lugar a la contracción peristáltica (Grider, 2003)

-La adventicia es la capa externa de tejido conectivo por donde van los vasos mayores y los nervios. En la cavidad abdominal se continúa con el tejido conectivo del mesenterio. Cuando está expuesta a la cavidad abdominal se la denomina serosa, la cual está tapizada por un epitelio plano simple llamado mesotelio.

A lo largo de todo el mesenterio se disponen los ganglios linfáticos. La diseminación por vía linfática tiene un papel fundamental en la patogénesis de muchos cánceres como éste, siendo un marcador pronóstico independiente de la enfermedad (Dillman, Aaron, Heinemann, & McClure, 2009; Washington, 2008).

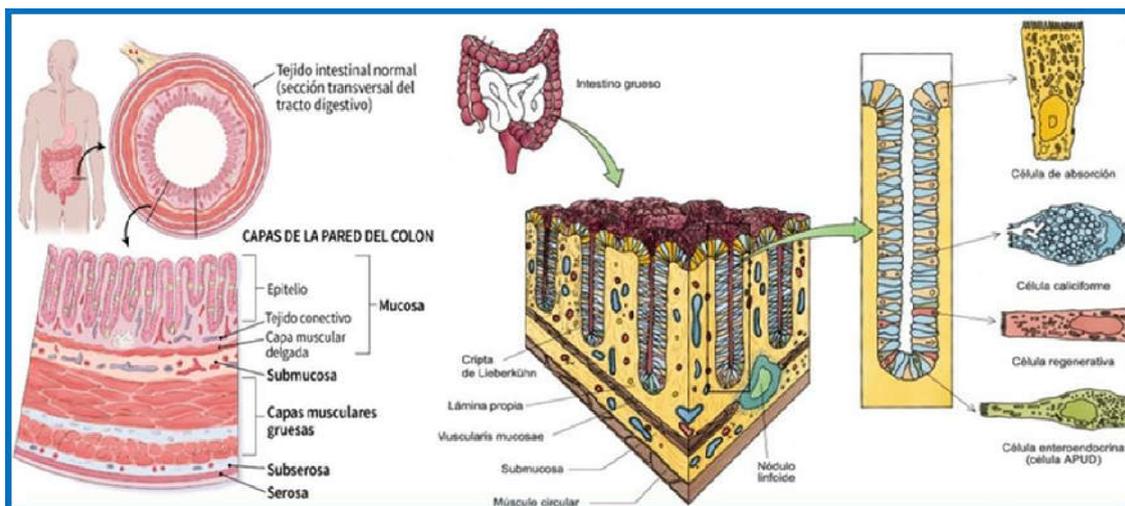


Figura 7. Características histológicas y citológicas del colon.

TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER DE COLON

Si los adenocarcinomas convencionales suponen el 85 % aproximadamente de los cánceres de colon (Figura 8), hay una larga lista de tipos histológicos según la última clasificación de la Organización Mundial de la Salud: (Bosman FT, 2010).

- Adenocarcinoma
- Adenocarcinoma mucinoso (coloide) (más del 50% de mucina)
- Carcinoma en anillo de sello (más de 50% de células en anillo de sello)
- Carcinoma medular
- Adenocarcinoma micropapilar
- Adenocarcinoma serrado
- Carcinoma de células escamosas
- Carcinoma adenoescamoso
- Carcinoma de células fusiformes
- Carcinoma neuroendocrino pobremente diferenciado
- Carcinoma neuroendocrino de célula grande
- Carcinoma neuroendocrino de célula pequeña
- Carcinoma mixto adenoneuroendocrino
- Carcinoma neuroendocrino indiferenciado

Además de las diferencias morfológicas existentes, también para el adenocarcinoma de células en anillo de sello y el adenocarcinoma de célula pequeña se ha visto que tienen un significado pronóstico adverso independientemente del estadio (Bernick *et al.*, 2004).

Asimismo, el carcinoma medular es un tipo histológico muy relacionado con la inestabilidad de microsátelites que puede darse esporádicamente o en pacientes con Síndrome de Lynch y que histológicamente suele crecer en nidos sólidos con un patrón organoide o trabecular, sin evidencia inmunohistoquímica de diferenciación neuroendocrina. Se caracterizan por tener un mejor pronóstico y por presentar un infiltrado inflamatorio linfocítico abundante (Knox *et al.*, 2015; Pyo, Sohn, & Kang, 2016; Wick, Vitsky, Ritter, Swanson, & Mills, 2005).

El carcinoma micropapilar se presenta como pequeños nidos de células en espacios con forma de hendidura y normalmente aparece en asociación con el adenocarcinoma convencional. Suele presentarse con metástasis linfáticas e invasión linfovascular (Haupt, Ro, Schwartz, & Shen, 2007).

Los adenocarcinomas serrados están formados por glándulas neoplásicas con múltiples indentaciones, células tumorales con citoplasma eosinófilo y núcleo basal y nada o mínima necrosis luminal. Se cree que este subtipo histológico está muy relacionado con los adenomas

serrados y que tienen un pronóstico peor que los adenocarcinomas convencionales (García-Solano *et al.*, 2010).

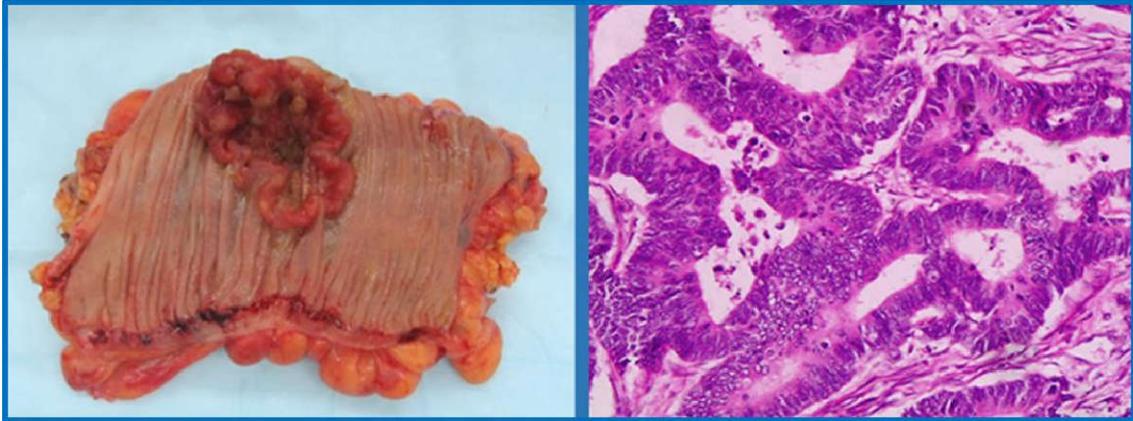


Figura 8. Cáncer de colon. Pieza macroscópica e imagen histológica.

GRADO HISTOLÓGICO

Uno de los parámetros histopatológicos que hemos valorado en este trabajo es el grado histológico de los adenocarcinomas primarios de colon y sus metástasis hepáticas. Habitualmente el grado de diferenciación o dediferenciación de un adenocarcinoma convencional se suele clasificar en:

G1 Bien diferenciado (>95% de glándulas)

G2 Moderadamente diferenciado (entre el 50 y el 95% de glándulas)

G3 Pobrementemente diferenciado (<50% de formación glandular)

G4 Indiferenciado (no diferenciación glandular ni presencia de mucina, ni diferenciación escamosa o neuroendocrina).

El grado histológico es otro de los factores pronósticos más importantes del CCR, a pesar de la no despreciable variabilidad entre observadores(Chandler & Houlston, 2008). Se ha demostrado que los tumores pobrementemente diferenciados tienen un pronóstico considerablemente peor (Cho *et al.*, 2009).

TUMOR BUDDING

Otro de los parámetros patológicos que hemos estudiado en este trabajo fue el *tumor budding* gemación tumoral. Este concepto fue expuesto en un primer momento por *Imai* en 1954(T. Imai, 1954). Consiste en la presencia de células sueltas o en pequeños grupos de menos de cinco células en el frente de invasión tumoral y es un factor pronóstico adicional importante para los pacientes con CCR. Se ha relacionado el *tumor budding* con la transición epitelio-mesénquima (Koelzer, Zlobec, & Lugli, 2016). La gemación tumoral se suele detectar hasta en un 20-40% de los pacientes con CCR y se considera un hallazgo histológico de agresividad y un predictor de metástasis linfáticas (Oh *et al.*, 2018). En el año 2016, una conferencia de consenso internacional sobre el *tumor budding* recomendó una serie de criterios para la evaluación del mismo(Lugli *et al.*, 2017):

- 1) La evaluación debe hacerse en los cortes de H&E pero si hay artefactos que impiden una correcta valoración como mucha inflamación se puede realizar la evaluación con la ayuda de una técnica inmunohistoquímica para citoqueratina, aunque siempre se debe realizar el recuento en la H&E.
- 2) El *tumor budding* se debe informar después de examinar minuciosamente todas las laminillas con tumor invasivo, seleccionando la mejor área de al menos 0.785 mm².
- 3) Se debe informar el número total de *buds*, así como el rango en una escala de tres (basado en el área de 0,785 mm²): bajo (0-4 *tumor buds*), intermedio (5-9 *tumor buds*) y alto (10 o más *buds*).

Actualmente el conteo de *tumor buds* no es un criterio histopatológico obligatorio a determinar y contemplar en un informe anatomopatológico, pero sí muy recomendable y especialmente parece tener su mayor importancia en los siguientes escenarios, donde podría asociarse a un peor pronóstico ():

- Adenocarcinomas que se originan en pólipos, donde los *tumor buds* indican un mayor riesgo de metástasis linfáticas.
- CCR en estadio II, ya que al tratarse de un indicador de peor pronóstico podría ayudar a seleccionar los pacientes que serían candidatos de terapia adyuvante.
- En las biopsias endoscópicas donde la presencia de *tumor budding* podría ayudar a identificar pacientes de alto riesgo candidatos a neoadyuvancia.

VÍAS DE DISEMINACIÓN O METÁSTASIS

La formación de metástasis a distancia es la fase más mortal de la progresión del cáncer y por tanto son las responsables de la mayoría de las muertes de los pacientes con cáncer (Wong & Hynes, 2006). Ahora bien, ¿cómo se disemina el cáncer a lugares distantes y distintos del organismo? Generalmente los tumores metastatizan a través de tres vías tales como la vía linfática, hematológica y por siembra en cavidades. La diseminación linfática es la más típica de los carcinomas mientras que la hematológica es preferida por los sarcomas, aunque existen numerosas vías de interconexión entre ambos sistemas, linfático y vascular, de manera que cualquier cáncer se puede diseminar por ambas (Wong & Hynes, 2006) (Sleeman, Cady, & Pantel, 2012) (Figura 9).

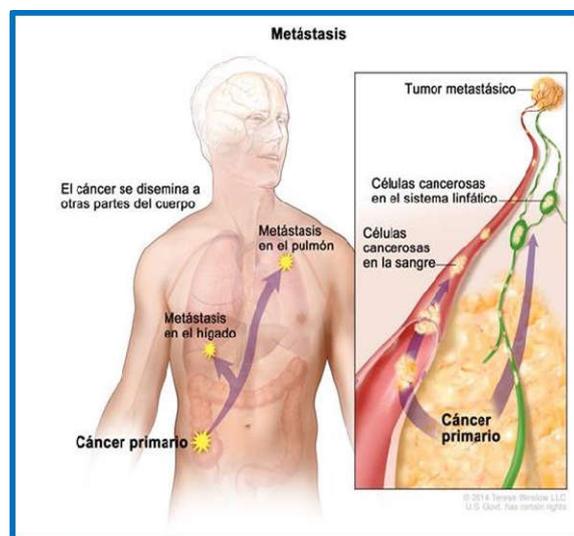


Figura 9. Proceso gráfico de las dos principales vías de diseminación metastásica, linfática y hematológica.

1) Diseminación linfática: Los tumores no poseen linfáticos funcionales, pero los vasos linfáticos localizados en los márgenes del tumor parecen ser suficientes para la diseminación linfática de las células tumorales (Padera *et al.*, 2002). El patrón de afectación de los ganglios linfáticos depende en gran medida del origen del tumor primario y de las vías naturales de drenaje linfático de la zona. Los carcinomas de pulmón que se originan en las vías respiratorias metastatizan primero a los ganglios linfáticos bronquiales regionales y, posteriormente, a los traqueobronquiales perihiliares y mediastínicos. Los carcinomas de mama normalmente se originan en los cuadrantes supero - externos y, por tanto, primero se diseminan a los ganglios linfáticos axilares. Sin embargo, los cánceres de los cuadrantes internos pueden drenar a través de la pared torácica a los ganglios de la arteria mamaria interna. En ambos escenarios, posteriormente pueden extenderse a los ganglios supraclaviculares e infraclaviculares. Las células cancerígenas pueden atravesar las cadenas linfáticas en los ganglios más próximos para quedarse

atrapadas en ganglios linfáticos más alejados y producen las denominadas *metástasis saltatorias*. Estas células son capaces de atravesar todos los ganglios linfáticos para alcanzar el compartimento vascular a través del conducto torácico. No obstante, los tumores casi siempre invaden las adenopatías secuencialmente, empezando por el más cercano (el llamado “centinela”) y seguido a continuación por los más distales (Nathanson, 2003). Si el ganglio centinela no está afecto, al ser el primer ganglio linfático regional que recibe el flujo linfático del tumor primario, el resto seguramente tampoco lo estén (Wittekind, 2000). Se puede identificar mediante la inyección de colorantes azules o trazadores radiomarcados cerca del tumor primario. La biopsia de los ganglios centinela permite determinar la extensión de la diseminación del tumor y puede usarse para planificar el tratamiento. En el cáncer de mama es crucial determinar la afectación de los ganglios linfáticos axilares para valorar la evolución de la enfermedad y para decidir el tratamiento más adecuado pero la biopsia del ganglio centinela también se ha utilizado para detectar la diseminación de los melanomas, cánceres de colon y otros tumores. En el CCR, aunque aún no está universalmente implantado y en la mayoría de los centros en nuestro país aún no se utiliza, la Dra. Miriam Cuatrecasas y col. han demostrado su potencial utilidad. El tratamiento del CCR en estadios iniciales I y II (pN0 M0) es quirúrgico y las guías oncológicas no recomiendan quimioterapia adyuvante. Hasta un 25% de pacientes en estadios I y II progresan con recidivas o metástasis y estas metástasis ganglionares determinan el tratamiento con quimioterapia adyuvante y son un importante factor pronóstico. Las no detectadas con H&E podrían ser marcadores de diseminación tumoral sistémica en pacientes en estadios iniciales de CCR. Métodos moleculares más sensibles (inmunohistoquímica o RT-PCR) permitirían detectar metástasis ganglionares “ocultas con H&E” e identificar pacientes pN0 con riesgo de recidiva que se beneficiarían de quimioterapia adyuvante. El problema es que en el método de diagnóstico estándar del estadiaje ganglionar se estudian los ganglios post-fijación en formol y no se analiza el 98% del tejido, con falsos negativos de hasta un 24% y con la posibilidad de no detectar metástasis ganglionares y consecuentemente la posibilidad de recidiva. Así, estos autores han realizado un estudio sobre el estadiaje ganglionar de pacientes con CCR mediante técnica molecular (OSNA) en la pieza de colectomía en fresco, estableciendo las siguientes conclusiones: El método OSNA es más sensible que la tinción con H&E para detección de metástasis ganglionares; objetivan un 43,12% de sobreestadiaje ganglionar molecular con el método OSNA versus el estadiaje patológico con H&E; la presencia de metástasis ganglionares detectadas por método OSNA podría ayudar a seleccionar aquellos pacientes con CCR en estadios I y II candidatos a tratamiento adyuvante y la disección en fresco de los ganglios linfáticos del mesocolon es factible y no representa una sobrecarga de trabajo. En definitiva, concluyen en su trabajo que la detección de ARNm de CK19 en los ganglios linfáticos, que es lo que detecta la técnica OSNA, se correlaciona con los clásicos factores de alto riesgo en pacientes con CCR en estadios I y II y la carga tumoral total es una

medida cuantitativa y objetiva que podría ayudar a estadificar mejor a pacientes con CCR en estadios tempranos (Aldecoa *et al.*, 2016).

En numerosas ocasiones los ganglios regionales actúan como barreras efectivas frente a la diseminación adicional del tumor, al menos temporalmente. Las células tumorales, después de su detención en el ganglio, podrían ser destruidas por una respuesta inmunitaria. Los productos necróticos de la neoplasia y los antígenos tumorales a menudo provocan respuestas inmunitarias en los ganglios, como hiperplasia de los folículos (linfadenitis) y proliferación de macrófagos en los senos subcapsulares (histiocitosis sinusal). Por lo tanto, el aumento de tamaño de los ganglios puede estar causado por diseminación y crecimiento de las células cancerosas o por hiperplasia reactiva. Así pues, el aumento de tamaño ganglionar en la proximidad de un cáncer, aunque siempre puede plantear dudas sobre su afectación metastásica, no implica necesariamente diseminación del tumor primario y es mandatorio verificar la presencia de tumor mediante estudio anatomopatológico (W. Z. He *et al.*, 2018; D. Sato *et al.*, 2017).

2) Diseminación hematogena: es la vía de elección de los sarcomas aunque, como ya se ha explicado anteriormente, también se da con frecuencia en los carcinomas (Pennacchioli *et al.*, 2012). La penetración en las arterias, como cabría esperar al poseer paredes más gruesas, es más difícil que en las venas (Lv *et al.*, 2018). No obstante, la diseminación arterial tiene lugar cuando las células tumorales pasan a través de los lechos capilares pulmonares o derivaciones arteriovenosas pulmonares o cuando las propias metástasis producen émbolos tumorales adicionales (Rogers, 2003). Son varios los factores que influyen en los patrones de distribución de las metástasis vasculares. Con la invasión venosa, las células transmitidas por la sangre siguen el flujo venoso que drena la zona de la neoplasia y, con frecuencia, las células tumorales se detienen en el primer lecho capilar que encuentran. Dado que todo el drenaje del área porta fluye hacia el hígado y todo el flujo sanguíneo de la cava fluye hacia los pulmones, el hígado y los pulmones son los órganos más frecuentemente afectados en la diseminación hematogena (Enquist *et al.*, 2014; Saitoh *et al.*, 1991). Los cánceres que se originan cerca de la columna vertebral habitualmente embolizan a través del plexo paravertebral. Esta vía se encuentra implicada en las frecuentes metástasis vertebrales de los carcinomas de tiroides y próstata (Amelot *et al.*, 2019). Determinados carcinomas tienen propensión a invadir las venas. Con frecuencia, el carcinoma de células renales invade la vena renal para crecer a modo de serpiente por la vena cava inferior, hasta alcanzar, a veces, la parte derecha del corazón, en general la aurícula (Shah *et al.*, 2018). También se han descrito casos excepcionales de metástasis cardíaca de un carcinoma renal sin afectación de la vena cava ni de la aurícula derecha (Sahin *et al.*, 2018). Los carcinomas hepatocelulares con frecuencia penetran en las raíces portales y hepáticas para crecer dentro de ellas en los canales venosos principales. De manera sorprendente, este crecimiento intravenoso puede no ir acompañado de una diseminación extensa. La evidencia histológica de invasión vascular en la localización del tumor primario es evidentemente una característica de muy mal

pronóstico. Estos cambios, no obstante, deben estudiarse con gran cuidado, porque no indican el desarrollo inevitable de metástasis (Munzone *et al.*, 2014). Numerosas observaciones sugieren que la mera localización anatómica de la neoplasia primaria y las vías naturales de drenaje venoso no explican totalmente la distribución sistémica de las metástasis. Por ejemplo, el carcinoma de próstata se extiende, sobre todo, al hueso (Bubendorf *et al.*, 2000); los carcinomas pulmonares tienden a afectar la glándula suprarrenal y el cerebro (Munoz Molina, Ovejero Diaz, & Gorospe Sarasua, 2019), y los neuroblastomas se extienden al hígado y a los huesos (Burchill *et al.*, 2017; Matthay, 2006). Por el contrario, los músculos esqueléticos y el bazo, aunque tienen abundantes capilares y reciben una gran cantidad de flujo sanguíneo, raramente son la localización de depósitos secundarios (Doroudinia, Mehrian, Dorudinia, & Kaghazchi, 2019; Efares *et al.*, 2016; Hirst & Powell, 2018).

3) Diseminación por siembra: muy minoritaria, se produce cuando las neoplasias invaden una cavidad corporal natural. Con frecuencia, esta cavidad afectada es la peritoneal pero puede afectarse cualquier otra (pleural, pericárdica, subaracnoidea y espacio articular) (Burazor, Imazio, Markel, & Adler, 2013; Kang *et al.*, 2018; Sugarbaker, 2005). Esta forma de diseminación es característica de los cánceres de ovario, que a menudo afectan extensamente las superficies peritoneales. Literalmente, los implantes pueden anidar en todas las superficies peritoneales, aunque sin invadir los tejidos subyacentes, lo cual puede parecer sorprendente. Este es un ejemplo de la capacidad de reimplantarse en otra parte, que es diferente a la capacidad de invadir (Mikula-Pietrasik, Uruski, Tykarski, & Ksiazek, 2018). Las neoplasias del sistema nervioso central, como el meduloblastoma o el ependimoma, pueden penetrar en los ventrículos cerebrales y ser transportados por el líquido cefalorraquídeo para reimplantarse en las meninges, ya sea en el cerebro o en la médula espinal (Pomeraniec *et al.*, 2015). Otro ejemplo sería el conocido como pseudomixoma peritoneal, producido por los carcinomas apendiculares secretores de moco que llenan la cavidad peritoneal de una masa neoplásica gelatinosa (Carranza-Martinez, Cornejo-Lopez, Monroy-Argumedo, & Villanueva-Saenz, 2014; Morera Ocon *et al.*, 2017).

2 RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y VARIABLES CLÍNICAS

Se seleccionaron 52 pacientes en el estudio cuyos datos epidemiológicos básicos y de supervivencia se describen en la tabla 5. De los 52 pacientes, 37 fueron varones y 15 mujeres con una media de edad global ligeramente superior a los 66 años. Más de tres cuartos de los adenocarcinomas de colon fueron originados en el colon izquierdo. Los tumores primarios tuvieron un tamaño medio cercano a los 4cm. Cerca de la mitad de las metástasis de adenocarcinoma de colon se produjeron en el lóbulo hepático derecho. Hasta casi un 12% de los pacientes (11 casos) tuvieron menos de 50 años en el momento del diagnóstico de la metástasis y de estos hasta dos tercios fueron varones, todos con tumores primarios en el colon izquierdo y con metástasis múltiples.

Tabla 5. Características epidemiológicas y de supervivencia de los 52 casos incluidos en el estudio.

Variables clínicas	Muestra
Estado del paciente (vivo)	29
Sexo: mujer (%)	15 (28,8)
Edad (meses): media (mínimo y máximo)	66,2 (41-80)
Localización: colon izquierdo (%)	40 (76,9)
Localización metástasis hepática:	
-Lóbulo hepático izquierdo (n)	12
-Lóbulo hepático derecho (n)	32
-Múltiple (n)	8
Diámetro máximo del tumor (cm): media (mínimo y máximo)	3,9 (1,2-6,4)
Supervivencia global (meses): media y desviación típica	30,7 ± 23,1
Supervivencia libre de enfermedad (meses): media y desviación típica	7,0 ± 12,1
Supervivencia post-metástasis (meses): media y desviación típica	23,2 ± 19,5

* n: número de casos.

VARIABLES HISTOLÓGICAS

Los resultados se resumen en la tabla 6. Todos los tumores fueron adenocarcinomas. Cabe destacar que algo más del 70% de los adenocarcinomas primarios de colón de nuestro estudio presentaron *tumor buds* y casi el 52% mostraron metástasis regionales a los ganglios linfáticos.

Tabla 6. Principales características histopatológicas de los tumores a estudio.

Variables histopatológicas	Tumores primarios	Metástasis hepáticas	p-valor
Mitosis: media (mínimo y máximo)	35,8 (3-104)	33,9 (7-88)	0,643
Necrosis (grados de 0 a 4): media	2,0	3,6	0,013
Grado de diferenciación: (1-3 Puntos):	1,8	1,6	0,528
-Blen (%)	19 (36,54)	26 (50)	
-Moderado (%)	24 (46,15)	16 (30,77)	
-Poco (%)	9 (17,31)	10 (19,23)	
Yemas tumorales (N)	37	-	
Ganglios regionales positivos	28	-	

En negrita se representan los datos con significación estadística $p < 0,05$

De entre las variables histopatológicas estudiadas cabe resaltar que no se identificaron diferencias significativas entre el número de mitosis por diez campos de gran aumento (CGA) ni entre el grado de diferenciación tumoral de los tumores primarios y las metástasis. Sin embargo, hemos observado que la necrosis intratumoral fue significativamente mayor en las metástasis, observando que la mayor parte de los casos mostraban amplias zonas de necrosis (Figura 10).

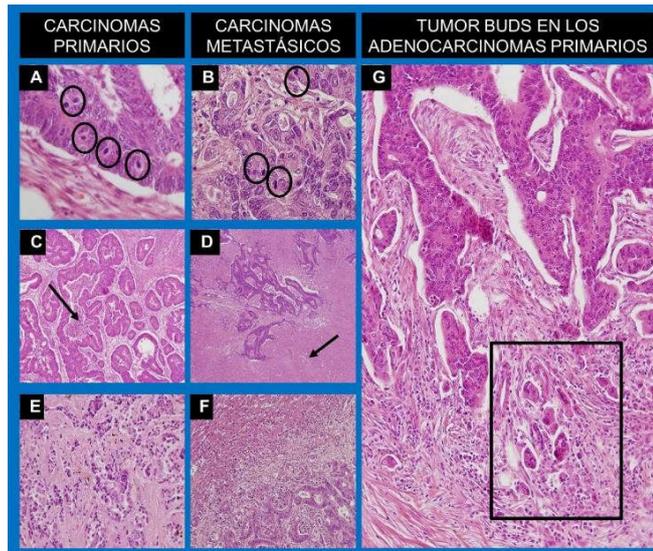


Figura 10. Características histológicas de los tumores primarios y metastásicos. (A,B) Mitosis. Figuras mitóticas presentes dentro de un círculo. (C,D) Necrosis. En la figura C se observa necrosis grado 1 (menor del 25%) y en la figura D necrosis grado 3 (50-75%) (E,F) Grado de diferenciación tumoral. En la figura E se observa un grado de diferenciación tumoral 3 y en la figura F un grado 1 (G) Tumor buds en el borde de infiltración tumoral. En un cuadro se destacan varios grupos de tumor buds. Amplificación: A y B 600x; C y D 100x; E y F: 200x; G: 400x. Tinción con H&E.

Finalmente, es importante destacar que, al diagnóstico de los adenocarcinomas primarios de colon, la mayor parte de los tumores fueron un pT3 (70,7%) seguidos de un estadio pT2 (17,1%) y de un estadio pT4 (12,2%). Además, cerca del 54% de los casos tuvieron adenopatías positivas y en 3 casos (7,3%) se observaron metástasis sincrónicas en el hígado. Desde el punto de vista del estadiaje, el 45% fue un estadio II, el 40% fue un estadio III, el 7,5% fue un estadio IV y también el otro 7,5% fue un estadio I. Por último, resaltar que son tumores de alto potencial maligno, con una supervivencia media aproximada de dos años y medio, con un tiempo libre de enfermedad de algo más de medio año y una supervivencia post-metástasis cercana a los dos años.

CORRELACIONES CLÍNICO PATOLÓGICAS DE INTERÉS

Los resultados se resumen en la tabla 7. Se observaron diferentes grados de correlación positiva entre la actividad mitótica del tumor primario y la supervivencia global ($r= 0,356$; $p= 0,021$, correlación moderada), la supervivencia post-metástasis ($r= 0,317$; $p= 0,041$ correlación leve-moderada), el tamaño del tumor primario ($r=0,340$; $p= 0,028$, correlación moderada), así como una correlación inversa entre esta actividad mitótica del tumor primario y el número de ganglios positivos ($r=-0,314$; $p= 0,049$, correlación inversa leve-moderada).

Tabla 7. Análisis de las correlaciones entre variables clínico-patológicas de interés del estudio. Destacan los tiempos de supervivencia, tamaño del tumor primario y la afectación de adenopatías.

	Edad	SG	TLE	SPM	Tamaño tumor	Ganglios positivos
SG	r= 0,293 p= 0,035					
TLE	r= 0,093 p= 0,511	r= 0,404 p= 0,003				
SPM	r= 0,221 p= 0,115	r= 0,823 p= 0,000	r= -0,045 p= 0,750			
Tamaño tumor	r = -0,112 p= 0,433	r= 0,156 p= 0,274	r= 0,150 p= 0,293	r= 0,136 p= 0,342		
Ganglios positivos	r= -0,191 p= 0,184	r= -0,215 p= 0,133	r= -0,081 p= 0,560	r= -0,163 p= 0,258	r= -0,029 p= 0,844	
Mitosis primario	r= 0,166 p= 0,292	r= 0,356 p= 0,021	r= 0,026 p= 0,872	r= 0,317 p= 0,041	r= 0,340 p= 0,028	r= -0,314 p= 0,049

*r, Coeficiente de correlación de Spearman. En negrita se representan los datos con significación estadística $p < 0,05$. SG= supervivencia global. TLE= tiempo libre de enfermedad; SPM= supervivencia post-metástasis.

Por otra parte, se observó una correlación positiva entre la supervivencia global y la edad ($r=0,293$; $p= 0,035$ correlación leve), entre el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global ($r=0,404$; $p= 0,003$, correlación moderada) y entre la supervivencia postmetástasis y la supervivencia global ($r=0,823$; $p= 0,000$, correlación intensa).

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Las principales curvas de supervivencia se representan en la figura 11. Hemos observado para los tres grados de diferenciación del tumor primario diferentes curvas de SG y SPM con significación estadística, dando un mejor pronóstico al bien diferenciado sobre los moderada y pobremente diferenciados. Así, la media de SG para los tumores primarios bien diferenciados fue de $256,05 \pm 35,11$ semanas (64 meses o 5,3 años aproximadamente); mientras que para los tumores pobremente diferenciados fue de $98,65 \pm 12,84$ semanas (24,7 meses o 2 años aproximadamente) ($p= 0,008$). En relación a la SPM, para los tumores primarios bien diferenciados fue de $216,81 \pm 30,48$ semanas (54,2 meses o 4,5 años aproximadamente); mientras que para los tumores pobremente diferenciados fue de $79,55 \pm 14,40$ semanas (19,5 meses o 1,6 años aproximadamente) ($p= 0,046$). En relación a la presencia o ausencia de yemas tumorales en el tumor primario, se observaron dos grupos de pacientes con diferente curva pronóstico de carácter significativo para el TLE ($p=0,013$; $31,4 \pm 7,9$ vs $9,8 \pm 2,3$ semanas; o aproximadamente 7,8 meses frente a 2,4 meses en los casos con presencia de yemas tumorales). En relación a la presencia o ausencia de adenopatías locorregionales durante el diagnóstico del tumor primario, se identificaron dos grupos

de pacientes con curvas de supervivencias diferentes significativamente tanto para la SG como para el TLE y la SPM. Así, aquellos pacientes sin presencia de ganglios positivos mostraron un mejor pronóstico en general y una mejor supervivencia en los tres tipos estudiados. Así, la SG en los casos con ganglios positivos fue de $139,93 \pm 18,45$ semanas (aproximadamente 35 meses o 2,9 años) y en aquellos casos sin ganglios positivos de $234,11 \text{ meses} \pm 27,92$ meses (aproximadamente 58,5 meses o 4,9 años) ($p= 0,020$). En cuanto al TLE, en aquellos casos con ganglios linfáticos positivos fue de $35,77 \pm 9,40$ semanas (aproximadamente 8,9 meses o 0,7 años) y en aquellos casos sin ganglios linfáticos positivos fue de $81,40 \pm 23,65$ semanas (aproximadamente 20,3 meses o 1,7 años) ($p= 0,027$). Finalmente, aquellos casos con ganglios positivos tuvieron una SPM de $117,25 \pm 19,70$ semanas (aproximadamente 29,3 meses o 2,4 años) mientras que los pacientes sin ganglios linfáticos positivos tuvieron una SPM de $190,20 \pm 24,66$ meses (aproximadamente 47,5 meses o 3,9 años) ($p=0,045$).

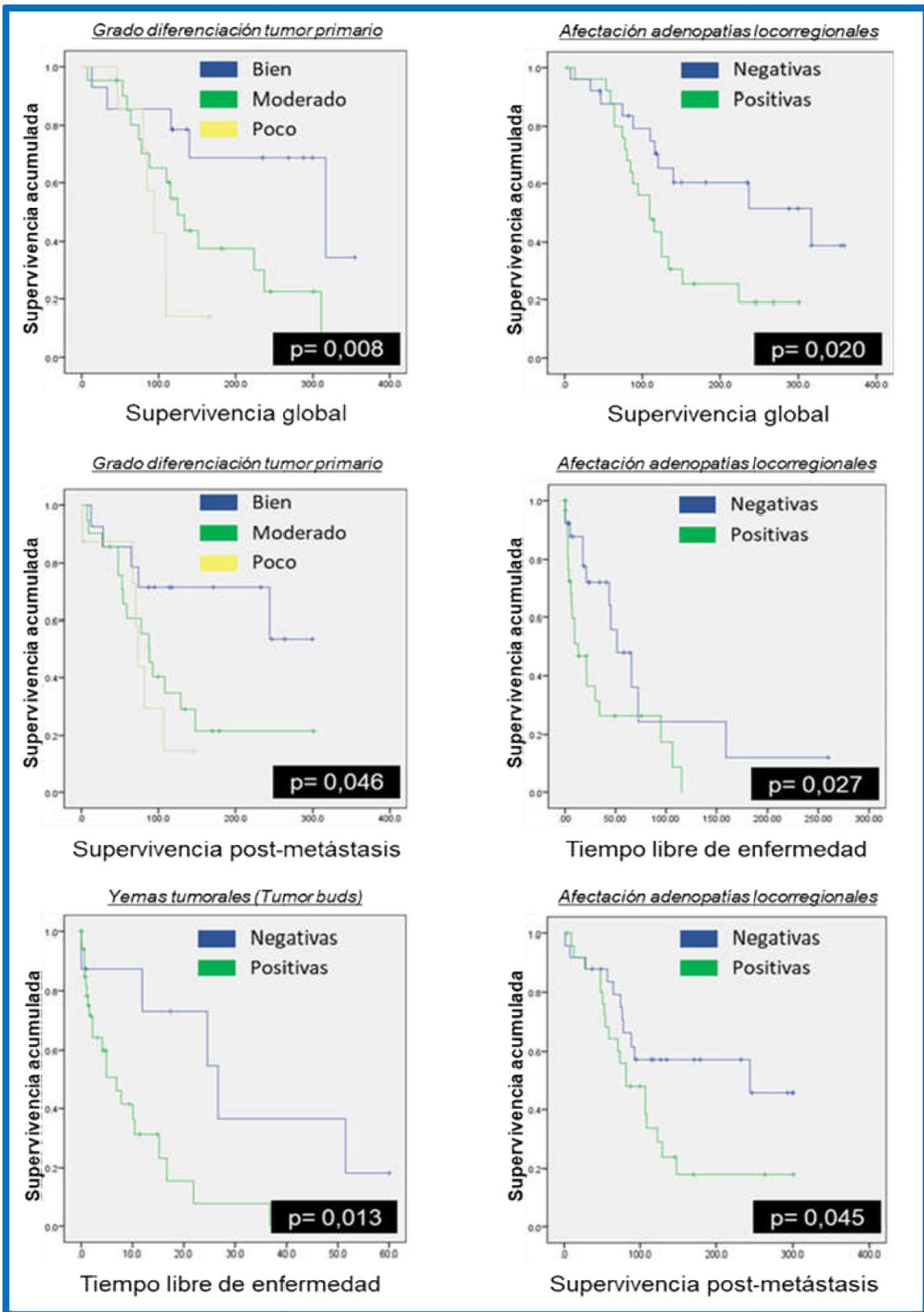


Figura 11. Análisis de supervivencia para diferentes parámetros histopatológicos. Curvas de supervivencia que muestran la separación de pacientes para diferentes tiempos de supervivencia y en función de las variables grado de diferenciación del adenocarcinoma de colon, yemas tumorales y afectación de adenopatías locorreionales. Se representan las variables en semanas excepto las yemas tumorales, en meses.

3 DISCUSIÓN

El CCR es un tumor muy prevalente en la sociedad occidental. Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos pueden ayudarnos a conocer mejor este tipo de tumores tan presentes en nuestra sociedad. Así, en nuestro estudio hemos caracterizado una población muy particular de pacientes que han tenido un adenocarcinoma de colon con metástasis hepáticas, lo que hemos denominado modelo de metástasis de adenocarcinoma de colon a hígado, operados en nuestro hospital. Son pacientes con un adenocarcinoma de muy alto potencial de malignidad que, tras los tratamientos radicales pertinentes, el tumor ha reaparecido y se ha diseminado al hígado. Es remarcable el hecho de que estos pacientes puedan ser operados de su metástasis hepática a pesar de estar en un estadio avanzado dentro de la historia natural de la enfermedad oncológica y ofrecer tasas de supervivencia mejores. En un estudio realizado por Joseph G. Fortner *et al*, con 247 pacientes consecutivos con metástasis hepáticas de CCR, justificaron este dato con la obtención de un 66% de supervivencia tras la metastasectomía a los 3 años en pacientes con enfermedad hepática confinada a la porción del hígado resecada (Fortner, Silva, Golbey, Cox, & Maclean, 1984; Padman et al., 2013). Estos datos, con una muestra mucho más amplia, no difieren en gran medida de nuestros resultados que, en este mismo supuesto, la SPM fue de $23,2 \pm 19,5$ meses. Otros autores también destacan una evidente menor SPM en aquellos pacientes que tienen metástasis múltiples hepáticas respecto a los que tienen una única (Wilson & Adson, 1976).

Los aspectos clínico-patológicos del CCR son esenciales para definir el pronóstico del mismo. En nuestro trabajo hemos destacado fundamentalmente la localización del tumor primario y su metástasis hepática, el tamaño tumoral primario, supervivencias, además de aspectos microscópicos relevantes, tales como el número de mitosis, el grado de necrosis tumoral, el grado de diferenciación tumoral, la presencia de yemas tumorales y la presencia de metástasis ganglionares preferentemente, y todo ello en 52 casos de pacientes con adenocarcinoma de colon y metástasis hepáticas. Aproximadamente el 65% de las personas con un cáncer de colon viven al menos 5 años (Lemini et al., 2018). En nuestro trabajo hemos incluido una muestra de casos donde el 50% estaba muerto ya a los 2,5 años de evolución de la enfermedad, a pesar de los tratamientos curativos realizados según protocolos internacionales.

En la literatura la mayoría de los estudios se centran preferentemente en caracterizar el tumor primario de colon sin un estudio pormenorizado de sus metástasis. Estos estudios son habitualmente numerosos en cuanto a casos incluidos, destacando uno con más de trescientos pacientes en donde han caracterizado histopatológicamente el adenocarcinoma primario de colon, teniendo en cuenta variables preferentemente microscópicas, sin contemplar un detallado estudio histomorfológico de las metástasis hepáticas (Ouchi et al., 1996; Yosuke Adachi, 1999). Sin embargo, existen estudios recientes que tienen un planteamiento similar, en donde han comparado el análisis de los tumores primarios y sus respectivas metástasis preferentemente desde un perfil

molecular, despreciando el aspecto histomorfológico. A destacar, los trabajos recogidos en la revisión del año 2018 por A. Blank *et al.*, en donde estudian la heterogeneidad del tejido aplicando métodos moleculares tales como inmunohistoquímica, carga mutacional, secuenciación, DNA tumoral libre circulante etc (Blank, Roberts, Dawson, Zlobec, & Lugli, 2018). Otros ejemplos en donde investigan y comparan resultados entre tumores primarios y sus metástasis están también más enfocados en determinar la expresión de dianas terapéuticas tales como PDL1 (Dislich *et al.*, 2017). Desde el punto de vista histomorfológico, hemos observado que de manera significativa el tejido metastático en el hígado procedente de los adenocarcinomas de colon mostró mayor grado o porcentaje de necrosis. Puede explicarse en parte por tratamientos adyuvantes como la quimioterapia perioperatoria (H. H. Chang, Leeper, Chan, Quan, & Driman, 2012), por infección necrotizante asociada (Sarmiento & Sarr, 2002) o por la propia naturaleza del tumor al encontrarse en un órgano diferente sin una neoangiogénesis consolidada (Karsch-Bluman *et al.*, 2019; Nishida, Yano, Nishida, Kamura, & Kojiro, 2006).

Otros planteamientos relacionados con el estudio histomorfológico del CCR destacan por comparar los adenocarcinomas primarios del colon derecho, frente a los del colon izquierdo. Esto se basa en que existen diferentes características embriológicas, epidemiológicas, fisiológicas, patológicas, genéticas y clínicas, que se ha traducido en describir diferencias en el curso, el pronóstico y el resultado de la enfermedad. Algunos de estos estudios son muy numerosos y comparan cohortes de casos de más de 1700 pacientes. En estos casos describieron que la tasa de tumores metastásicos fue ligeramente mayor en el grupo del lado derecho y observaron también una tasa de supervivencia más alta en los del lado izquierdo, sin identificar diferencias significativas en cuanto a la supervivencia (Dae Ro Lim, 2017; Helvaci *et al.*, 2019). En nuestro estudio la mayoría de casos fueron originarios del colon izquierdo y el mayor número de metástasis se produjo principalmente en el hígado derecho, ya que también es significativamente mayor que el lóbulo hepático izquierdo. Además, trabajos previos no relacionados directamente con las variables de este estudio ponen de manifiesto importantes asociaciones morfo-genéticas para el CCR (Cancer Genome Atlas, 2012). Por ejemplo, aquellos con una histología glandular convencional exhibieron una carga mutacional significativamente menor que tumores con otras histologías. En segundo lugar, mientras que los subtipos CpG island fenotipo metilador (CIMP) se correlacionan estrechamente con los tumores con histología tipo de alta inestabilidad de microsatélites, se encontraron diferencias morfológicas entre los tumores con alto CIMP con o sin alta inestabilidad de microsatélites. En tercer lugar, la histología mucinosa se asocia a una firma molecular específica caracterizada por una más alta tasa mutacional o alteración del número de copias en genes tales como BRAF, PIK3CA, SMAD2 y SMAD4 y una tendencia hacia una carga menor de mutaciones en APC o p53. En cuarto lugar y no menos importante, estos autores encontraron en este estudio que solo un pequeño subgrupo de CCR muestran sobreexpresión de

ARN de genes que actualmente suponen dianas para tratamientos; estos tumores eran principalmente de alta inestabilidad de microsatélites y tenían distintas características morfológicas: no mucinosos con un patrón de crecimiento sólido que incluye a su vez un patrón de crecimiento medular y no medular y a menudo contienen linfocitos intratumorales (TILs), si bien el número de TILs no tiene por qué ser siempre alto y en los casos sin inestabilidad de microsatélites (MSS) dichos linfocitos pueden ser apenas reconocibles. Este estudio fue el primero en mostrar una asociación directa entre el número de mutaciones somáticas y los patrones morfológicos en los tumores (Shia et al., 2017).

Con respecto a la actividad proliferativa de los adenocarcinomas de colon, hemos identificado que a mayor actividad mitótica del tumor primario los pacientes mostraban una mejor SG. Trabajos como los de Sinicrope FA *et al.*, describen cómo la apoptosis y la necrosis parecen estar en relación con el desarrollo y la progresión del cáncer y concluyen que el aumento del número de mitosis estaría en relación con supervivencias más bajas en pacientes con ganglios linfáticos negativos, sin presencia de metástasis (Sinicrope *et al.*, 1999). También hemos observado una correlación positiva entre la actividad proliferativa del tumor primario y el tamaño del mismo, así como una progresión a adenopatías positivas. Trabajos previos en la literatura describen hallazgos similares (Kohoutova, Pejchal, & Bures, 2018). También se ha descrito que un debut de CCR en gente joven suele ser en fases más avanzadas que en pacientes mayores, de manera que tal y como hemos observado en nuestro estudio, existe una correlación débil pero positiva entre la aparición de un CCR a mayor edad y un mejor SG (McKay et al., 2014). Hemos identificado también una correlación entre los periodos de supervivencia tanto SG, TLE y SPM, lo que refuerza la fiabilidad de los datos recogidos y está dentro del contexto práctico de la historia natural del cáncer (Allemani, 2018 #557). Hemos identificado también una correlación entre los periodos de supervivencia tanto SG, TLE y SPM, lo que refuerza la fiabilidad de los datos recogidos y está dentro del contexto práctico de la historia natural del cáncer (Allemani et al., 2018)

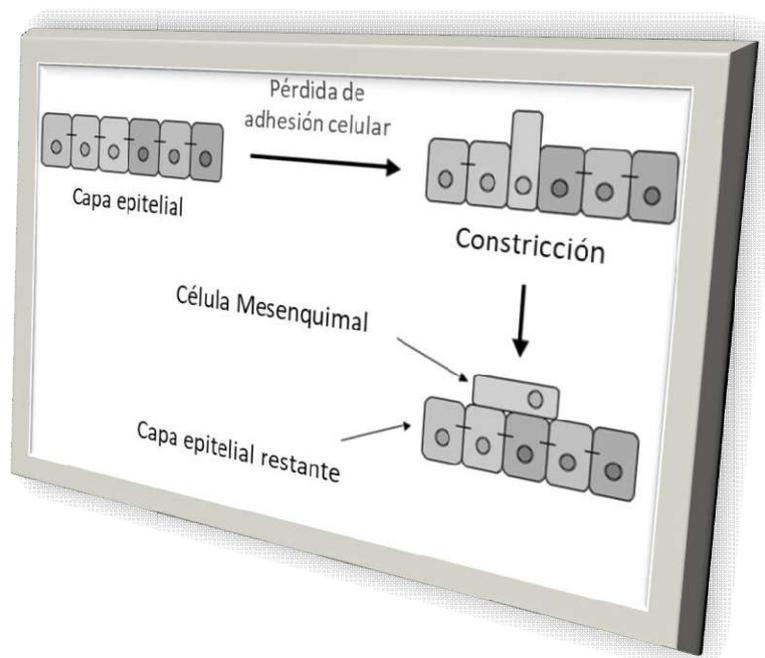
En relación al análisis de supervivencia desarrollado en nuestro trabajo, hemos observado como los pacientes se segregaban en función del grado de diferenciación tumoral del adenocarcinoma primario de colon generando curvas de SG y SPM acordes a lo previamente descrito en la literatura. Así, tumores mejor diferenciados tienen mejores curvas de supervivencia que los peores diferenciados (Schneider & Langner, 2014). En relación a las yemas tumorales *otumor budshemos* observado una supervivencia libre de enfermedad más baja para el grupo de pacientes positivos. Este concepto, aunque aún no ampliamente establecido en los informes anatomopatológicos del CCR, sí que parece estar claramente demostrado desde hace algunos años como factor de pronóstico adverso en la literatura, independientemente del TNM y relacionado con el proceso de la transición epitelio–mesénquima (EMT) (Mitrovic, Schaeffer, Riddell, &

Kirsch, 2012; Prall, 2007). En las recomendaciones de la clasificación de la WHO el pequeño componente de pobremente diferenciado en el frente de avance del tumor no se considera que afecte al grado histológico (Chandler & Houlston, 2008). Sin embargo, la morfología del tumor en dicho frente invasivo del tumor se sabe que refleja de manera bastante certera la actitud biológica del tumor (Riddell RH, 2002). Así, por ejemplo, se ha descrito con anterioridad como los *tumor buds*, células cancerígenas sueltas o pequeños grupos tumorales en el frente de avance de la neoplasia están muy relacionados con las metástasis linfáticas e inversamente relacionados con la supervivencia postquirúrgica (Hase K, 1993; Hase, Shatney, Johnson, Trollope, & Vierra, 1993; M. J. Ueno H, Jass JR, *et al.*, 2002; P. A. Ueno H, Wilkinson KH, *et al.*, 2004). Además, hay autores que recientemente han publicado que este parámetro debería evaluarse en un área más amplia y graduarse en 3 grupos, especificando además que este grado es más importante para el pronóstico que la mera presencia de las yemas tumorales. Afirman también que la presencia de yemas tumorales se relacionó con un riesgo mayor de progresión tumoral y disminución del TLE. En este sentido, describen que la presencia de yemas tumorales en los tumores primarios se asocia con otros factores pronósticos tales como el mayor número de ganglios linfáticos positivos y la presencia de invasión linfovascular e invasión perineural (Martinez-Ciarpaglini *et al.*, 2019). La presencia de yemas tumorales también fue ampliamente estudiada en otros tipos de tumores (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2017). Un ejemplo son los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, donde los autores identifican un pronóstico adverso en el grupo de pacientes que tenían yemas tumorales en sus tumores. Por otra parte, y aunque en nuestro trabajo no hemos identificado un valor pronóstico significativo para la necrosis en el tumor primario o en la metástasis, previos estudios han destacado que la presencia de necrosis en los adenocarcinomas primarios de colon supone un factor pronóstico independiente en lo que respecta a la SLE y la supervivencia cáncer-específica (Pollheimer *et al.*, 2010; Vayrynen *et al.*, 2016). Además, la presencia de necrosis se asoció a un estadio avanzado, CCR pobremente diferenciados, invasión vascular, mayor grado histológico y mayor tamaño tumoral. No se encontró, sin embargo, correlación entre la necrosis y la localización tumoral (Gao, Arbman, Wadhra, Zhang, & Sun, 2005). La ausencia de necrosis (“sucia”) parece estar relacionada significativamente con la pérdida de expresión de la proteína MMR y/o la inestabilidad de microsatélites (Greenson *et al.*, 2003; Greenson *et al.*, 2009). Esto podría explicarse por el mejor pronóstico que tienen estos tumores (Popat, Hubner, & Houlston, 2005). Esta relación entre la necrosis tumoral y el peor pronóstico de los tumores que la presentan se justifica en parte por el rápido desarrollo del tumor que ha crecido más que su propio suministro vascular, creando un microambiente hipóxico y por tanto causando la muerte celular (Swinson *et al.*, 2002). Finalmente, hemos observado que la presencia de adenopatías locorregionales positivas en nuestra población de casos separó a los pacientes en dos grupos con una significativa peor SG, TLF y SPM. Este es un hecho ampliamente conocido que da fiabilidad a los datos de la muestra y una característica de la historia natural del cáncer por la que se basan las principales

clasificaciones para estadificar los tumores y establecer los pronósticos adecuados (J. Li et al., 2014; Q. Liu, Luo, Cai, Li, & Li, 2018).

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LAS PRINCIPALES MOLÉCULAS DE TRANSICIÓN EPITELIO–MESÉNQUIMA



1 INTRODUCCIÓN

CONCEPTO DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

La EMT es un conjunto de eventos que permiten la conversión de células epiteliales, perfectamente unidas entre ellas formando un tejido estructurado, en células fibroblásticas con fenotipo mesenquimal, con capacidades migratorias y de invadir la matriz extracelular (Savagner, 2010). La EMT tiene un papel fundamental en el desarrollo del cuerpo humano. Este concepto se describió por primera vez a principios de los años 80 por su papel determinante en el desarrollo embrionario donde las células epiteliales sufren abundantes cambios que incrementan entre otros aspectos su movilidad (Mjaatvedt & Markwald, 1989). El término EMT también se utilizó posteriormente por su papel en la respuesta fisiológica al daño tisular. Así, durante la EMT, las células basales epiteliales pierden su “fenotipo epitelial”, incluyendo sus adhesiones laterales célula a célula (uniones de adherencia, desmosomas y las uniones fuertes) y las adhesiones célula-matriz (hemidesmosomas) a la membrana basal, dando lugar a una pérdida de la polaridad apical-basal. Las células pierden marcadores epiteliales como la E-cadherina y aumentan la expresión de otros mesenquimales como la vimentina. Conviene aclarar en este punto que la expresión intracelular de vimentina es normal en la mayoría de las células mesenquimales, incluyendo los glóbulos blancos de la sangre. Sin embargo, su expresión en superficie está asociada sólo con células cancerígenas. Estas células con fenotipo mesenquimal adquieren propiedades invasivas, con capacidades migratorias, ganando resistencia a la apoptosis, aumentando la secreción de enzimas degradativas y degenerando la matriz extracelular subyacente (Banyard & Bielenberg, 2015) (Figura 12).

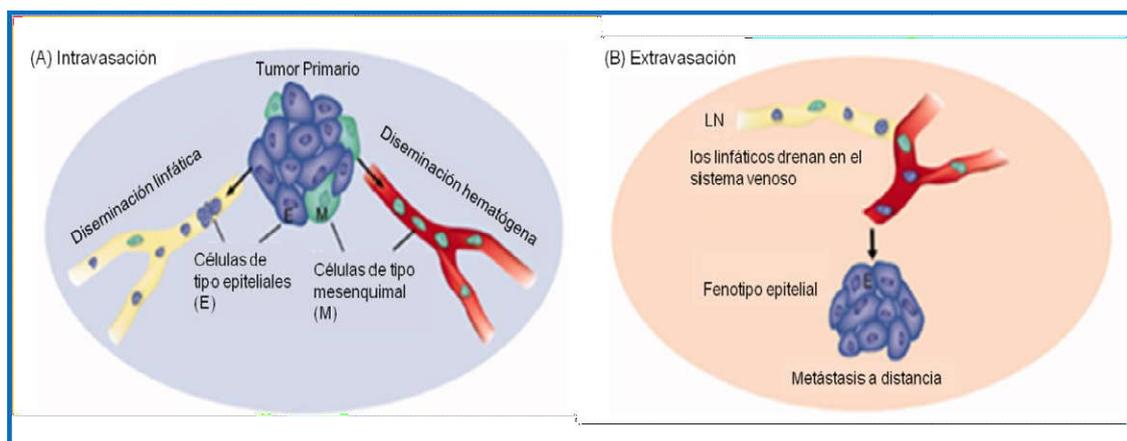


Figura 12. Estado transición epitelio-mesénquima para metástasis linfáticas y hematogénas. (A) Intravasación. Las células cancerígenas que hacen transición al epitelio mesenquimal (M, color verde) son capaces de digerir la membrana basal capilar e invadir el vaso sanguíneo (diseminación hematogénica). Las células tumorales de fenotipo epitelial (E, color azul), fenotipo epitelial-mesenquimal parcial (no se muestran) o las de fenotipo mesenquimal pueden entrar en el capilar linfático (diseminación linfática). (B) Extravasación. Los vasos linfáticos finalmente drenan su contenido en el sistema venoso. La salida de los vasos sanguíneos a un órgano secundario no requiere la EMT (al menos en el pulmón, hígado o médula ósea donde la membrana basal capilar es mínima). Las metástasis en el sitio secundario se parecen a los tumores primarios en que son principalmente de fenotipo epitelial (Modificado de Banyard & Bielenberg, 2015).

Los cambios característicos durante el desarrollo se han llamado “EMT tipo I” y son casi completos en su transición al fenotipo mesenquimal aunque transitorios en el tiempo y a menudo están seguidos de una reconversión al fenotipo epitelial para crear un epitelio secundario. La “EMT tipo II” describe cambios que ocurren durante la inflamación y la fibrosis y puede ser completa o parcial en su transición a mesenquimal y ocurre durante periodos prolongados de tiempo, a menudo con consecuencias patológicas. La “EMT tipo III” es la que está involucrada en la progresión del cáncer. El cambio a un fenotipo más mesenquimal puede promover la intravasación de las células tumorales en los vasos sanguíneos y la migración a un nuevo órgano, pero no es necesaria para la extravasación o la colonización en ese medio. Por otra parte, la diseminación linfática no requiere necesariamente de la EMT (Banyard *et al.*, 2014) (Banyard *et al.*, 2013; Tsuji *et al.*, 2008) (Figura 13).

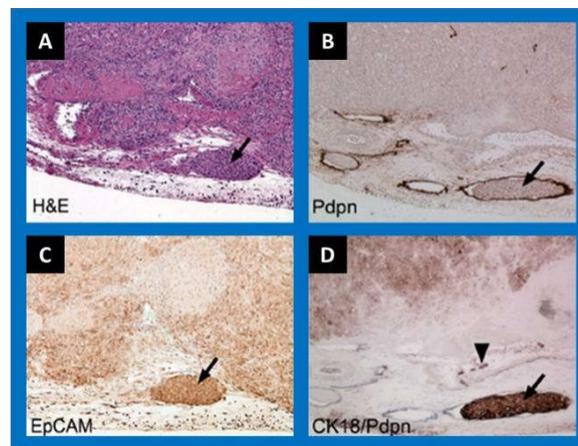


Figura 13. Representación que demuestra que las células tumorales de los vasos linfáticos peritumorales son de fenotipo epitelial. (A) H&E; (B, D) podoplanina (Pdpn); (C) EpCAM; o (D) Citoqueratina 18. En distintas secciones seriadas se muestran células tumorales dentro de vasos linfáticos en la periferia del tumor (flechas). Los vasos linfáticos se identificaron con la tinción de podoplanina (B, color marrón; D, color negro). Las células tumorales dentro de los vasos linfáticos se tiñen con los marcadores epiteliales, EpCAM (C, color marrón) y Citoqueratina 18 (D, color marrón). Esto demuestra que las metástasis linfáticas no requieren la transición epitelio-mesénquima (Modificado de Banyard & Bielenberg, 2015).

Es por todo esto que la EMT se ha considerado a menudo esencial para el desarrollo de las metástasis. Un problema importante con el concepto de la EMT es que las metástasis humanas histológicamente parecen epiteliales fenotípicamente y se parecen al tumor primario (Chui, 2013). Esto se suele explicar por la teoría de la transición Mesenquimal-Epitelial (Thiery, 2002). En ella, las células tumorales que han experimentado la EMT pueden intravasarse en los vasos sanguíneos en el tumor primario y extravasarse en los órganos a distancia donde van a metastatizar, pero deben de volver a tener un fenotipo epitelial para crecer en dicho órgano secundario y convertirse en una masa clínicamente detectable. Diversos investigadores han sugerido que hay una cooperación entre las células epiteliales y las mesenquimales, de tal manera que estas últimas facilitan el

escape de las células epiteliales, por su ventaja proliferativa en el lugar de metástasis y de esta manera constituyen la mayoría de la masa tumoral metastásica (Scheel & Weinberg, 2012).

Los carcinomas son tumores malignos de origen epitelial formados por células genéticamente inestables, es decir, que no parten de un fenotipo epitelial puramente normal y sí de un fenotipo atípico activado. Aunque la EMT en el cáncer comparte muchas características con el tipo I, propia del desarrollo, la transición es muchas veces es heterogénea y/o incompleta. Algunas características distintivas de la EMT tipo III (la propia de la progresión tumoral) son la expresión anormal de oncogenes y la falta de genes supresores tumorales en las células neoplásicas (Kalluri & Weinberg, 2009). Teniendo en cuenta la heterogenicidad e inestabilidad genética de las células tumorales, no es de extrañar que en la EMT tipo III la plasticidad tumoral se acompañe en ocasiones de un cambio en un subgrupo variable de marcadores de la EMT, que puede ser diferente entre células tumorales y vías de esta transición. Y es que este proceso supone una serie escalonada de eventos solapados e interrelaciones que pueden ser muy variables. Así, la expresión de marcadores clave como la E-cadherina o la vimentina están alterados en la mayoría de los tipos celulares, pero hay diferentes perfiles de expresión de otros muchos marcadores de EMT en diferentes células cancerígenas. Se sabe que este proceso supone interacciones entre diversos niveles de regulación. Muchas proteínas estructurales representan el perfil de marcadores característico de la EMT y la expresión de estas moléculas está mediada por otros mecanismos adicionales de control que incluyen reguladores de la transcripción y de la traducción, estabilidad proteica y *splicing* alternativo (De Craene & Berx, 2013; Samatov, Tonevitsky, & Schumacher, 2013; Warzecha & Carstens, 2012; Wu, Tsai, Wu, Teng, & Wu, 2012; Zheng & Kang, 2014).

La maquinaria molecular de la EMT se ha dividido y clasificado en tres categorías: inductores, reguladores y efectores (Tsai & Yang, 2013).

-Los inductores: Son los factores de crecimiento y receptores que marcan inicialmente la EMT. Destaca el TGF- β como el mejor estudiado y el más potente (Papageorgis, 2015). Las células epiteliales transformadas secretan factores de crecimiento de manera autocrina, como TGF- β y otros como EGF, HGF, FGF, que sustentan su crecimiento continuo. Estos factores de crecimiento se unen a su respectivo receptor tirosina quinasa (RTK) y de esta manera inducen la EMT. A medida que el tumor crece, su centro se queda en situación de hipoxia e induce la sobreexpresión de múltiples mediadores angiogénicos, como VEGF, IGF, TGFB, HGF, FGF, Wnt and Notch, que favorecen la EMT como estrategia adaptativa para paliar el ambiente hipóxico hostil del tumor (Jiang, Tang, & Liang, 2011). La inflamación inducida por la neoplasia atrae al medio células inmunes que secretan citoquinas como TNF- α , IFN- δ , IL-6 e IL-1 β . Los mediadores crónicos inflamatorios inducen la expresión de factores de transcripción como las proteínas snail

y ZEB, que reprimen el fenotipo epitelial y promueven la fibrosis, la EMT y las metástasis (Lopez-Novoa & Nieto, 2009).

-Los reguladores: Existen varios factores de transcripción que dirigen la transición hacia el fenotipo mesenquimal, y muchos de ellos actúan reprimiendo los genes epiteliales tales como Snail 1 (SNAI1), Slug (SNAI2), ZEB1 y ZEB2, que se unen directamente al promotor de la E-cadherina para inhibir su expresión. Existen además nuevas familias de moduladores transcripcionales como las proteínas GATA, SOX y FOX que regulan el destino celular, la diferenciación y la polaridad celular entre otros aspectos (Greening *et al.*, 2015; J. M. Lee, Dedhar, Kalluri, & Thompson, 2006; Su, Yin, Zhou, Wei, & Wang, 2015). Por último, los microARNs, aunque no son factores de transcripción, pueden también silenciar la expresión génica de proteínas altamente implicadas en el mecanismo.

-Los efectores: El proceso de la EMT implica cambios en los niveles y la localización de muchos componentes estructurales de las proteínas en las adhesiones célula a célula y de célula a matriz extracelular, destacando las uniones adherentes, desmosomas y hemidesmosomas. A destacar la familia de las cadherinas en donde la cadherina epitelial (E-cadherina) se transforma en cadherina neural (N-cadherina) (Banyard & Bielenberg, 2015). Otros cambios relacionados con la unión celular incluyen cateninas, claudinas, desmocolinas y JAMs (moléculas de adhesión y unión). Las alteraciones en las proteínas celulares de superficie junto con los cambios en las proteínas del filamento intermedio del citoesqueleto, como vimentina y queratinas, actúan para cambiar la forma celular y su comportamiento desde células estables interconectadas a células sueltas, fusocelulares y móviles de tipo mesenquimal. Típicamente, cuando las células epiteliales tumorales pierden su adhesión a la matriz y entran al sistema vascular, se hacen susceptibles a la apoptosis por un proceso que se conoce como *anoikis*, que es la apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular o porque las interacciones célula-matriz son insuficientes o inapropiadas (Cao, Livas, & Kyprianou, 2016; Paoli, Giannoni, & Chiarugi, 2013). Sin embargo, las células mesenquimales están protegidas de la *anoikis* por varias vías de señalización tales como PI3K/AKT, NF-KB, Wnt/ β -catenina y p53/p63, que a su vez también aumentan la resistencia a los fármacos y bloquean la vigilancia inmune, procesos ambos que promueven las metástasis (Tiwari, Gheldof, Tatar, & Christofori, 2012).

Es importante tener en cuenta que las células tumorales presentan bastante plasticidad y heterogenicidad. El cambio que supone la EMT puede no ser suficiente para describir todos los tipos de fenotipos migratorios que se pueden observar en las células cancerígenas, pero sí representa una forma de comportamiento invasivo. Friedl y Wolf clasificaron la migración de las células tumorales en “movimiento de células individuales” o “movimiento de células colectivamente” (Friedl & Wolf, 2003). En el primero, se describe cómo las células con fenotipo

mesenquimal se mueven, siendo uno de los lados de la célula el que lidera el movimiento y forma adhesiones focales entre las integrinas y la matriz extracelular, liberando enzimas proteolíticas en la dirección indicada, contrayéndose con haces de fibras de actomiosina y acabando con la separación de la célula. Sin embargo, otras células invasivas son menos mesenquimales en cuanto a su morfología y perfil de marcadores. Estos patrones de migración de células se llaman “ameboide” y se dan en células que son más epiteliales o al menos han experimentado una EMT más incompleta. Las células tumorales son realmente diversas y pueden cambiar rápidamente entre la migración ameboide y la mesenquimal. Los carcinomas invasivos, pero bien diferenciados, como los de próstata o mama, tienden a invadir y metastatizar con un movimiento de migración de células colectivo. Sus células pierden algunas de sus moléculas de adhesión, pero mantienen sus adhesiones célula a célula a destacar la E-cadherina y por lo tanto, son más epiteliales fenotípicamente y se dice que experimentaron una EMT parcial o incompleta. Esta migración de células de manera colectiva se da también en la invasión linfática por parte de grupos de células tumorales (Hasebe *et al.*, 2010; J. A. Lee, Bae, Woo, Kim, & Kim, 2011; Migliozi, Mucka, & Bielenberg, 2014). No obstante, la migración de células colectiva se puede convertir en migración de células individuales por la vía de TGF- β y la inhibición de esta puede hacer que las células tumorales vuelvan al movimiento de migración colectivo (Giampieri *et al.*, 2009). Es importante señalar como las células tumorales con un movimiento de invasión colectiva son capaces de diseminar por vía linfática pero no de causar metástasis hematógenas, para lo que haría falta la EMT completa (Giampieri *et al.*, 2009).

Por último, la EMT está muy ligada a la teoría de la célula madre cancerígena, que defiende que la mayoría de las células tumorales carecen de habilidad para comenzar el proceso de la tumorigénesis y que solo un pequeño grupo de células madre pueden dar lugar al proceso de metástasis. Estas células tienen una plasticidad que les permite cambiar de un estado epitelio-mesénquima a uno mesénquima-epitelio y realizar esta transición importante en el desarrollo de las metástasis. Comprender este proceso proporciona una buena oportunidad para estudiar la heterogeneidad tumoral y los mecanismos de resistencia a fármacos con las posibles implicaciones que podría tener en la práctica clínica en cuanto al tratamiento de estos pacientes (Shibue & Weinberg, 2017) (Mitra, Mishra, & Li, 2015).

A continuación, describiremos las principales moléculas implicadas en la transición epitelio-mesénquima que estudiaremos en nuestro trabajo: moléculas de fenotipo epitelial como la E-cadherina, β -catenina y CD-138 o Sindecano; y moléculas de fenotipo mesenquimal como la vimentina, actina de músculo liso y desmina.

MOLÉCULAS EPITELIALES

E-CADHERINA

Las cadherinas son una familia amplia de glucoproteínas de membrana o transmembrana responsables de las uniones célula a célula de manera calcio dependiente en las células epiteliales y son moléculas clave en la morfogénesis de una variedad importante de órganos (Halbleib & Nelson, 2006; Lien, Klezovitch, & Vasioukhin, 2006). La E-cadherina, codificada por el gen *CDH1* en el cromosoma 16q22.1, se caracteriza por tener funciones clave en el comportamiento de las células epiteliales, en la formación de tejidos y en la supresión del cáncer. Se ha investigado ampliamente sobre ella tanto en condiciones normales como patológicas al tratarse de la primera descrita de la superfamilia de las cadherinas y por lo tanto se la considera el prototipo de todas ellas. Los mecanismos que interrumpen la función supresora de la E-cadherina en el cáncer son mutaciones germinales y somáticas inactivadoras, la silenciación epigenética por metilación del DNA y los factores de transcripción que inducen la EMT y el procesamiento de proteínas disregulado (van Roy & Berx, 2008).

Para los patólogos, con sus limitaciones, la E-cadherina muestra principalmente su utilidad en el diagnóstico diferencial entre el carcinoma ductal de mama y el lobulillar, así como para distinguir el carcinoma ductal in situ del lobulillar in situ (Canas-Marques & Schnitt, 2016; Jacobs, Pliss, Kouria, & Schnitt, 2001) (Figura 14). Además, se utiliza como marcador de precursores eritropoyéticos inmaduros (Ohgami, Chisholm, Ma, & Arber, 2014). Se expresa inmunohistoquímicamente con una tinción de membrana en la mayoría de los tejidos tumorales, a excepción de los gliomas, los linfomas y los carcinomas de células renales (Behnsawy et al., 2013; Ohshima et al., 2001; W. Wu et al., 2013).

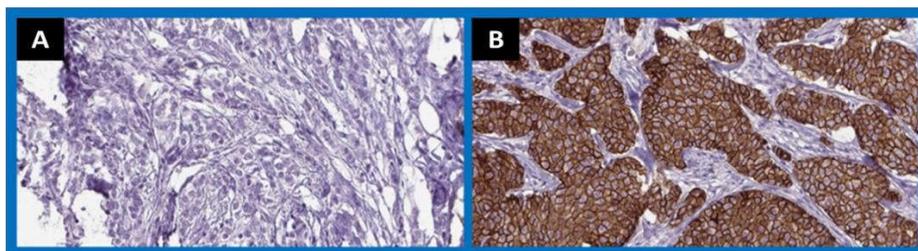


Figura 14. Inmunohistoquímica para E-cadherina en el cáncer de mama. Adenocarcinoma de mama lobulillar con ausencia de inmunoposición para E-cadherina (A) y Adenocarcinoma de mama ductal con inmunoposición fuerte para E-cadherina de membrana en >75% de las células (B) (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

La pérdida de expresión de E-cadherina en las células tumorales puede promover la migración celular y la invasión. Así, en el CCR, numerosos estudios han demostrado la asociación entre la expresión reducida de E-cadherina y un patrón de crecimiento infiltrativo y la presencia de metástasis linfáticas, así como con un estadio patológico más alto (S. A. Kim *et al.*, 2016) y

otros incluso con la presencia de metástasis a distancia (X. He, Chen, Jia, & Zhao, 2013; Rashed *et al.*, 2017) (Figura 15).

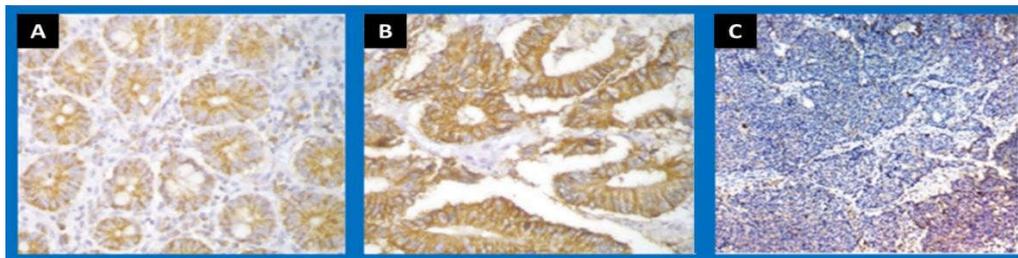


Figura 15. Inmunohistoquímica para E-cadherina en diferentes tejidos sanos y tumorales. Mucosa colónica normal mostrando tinción de membrana completa para E-cadherina (A), adenocarcinoma de colon bien diferenciado con inmunoexpresión para E-cadherina conservada (B) y (C) Adenocarcinoma de colon pobremente diferenciado mostrando inmunoexpresión de E-cadherina reducida (Imágenes modificadas de Rashed *et al.*, 2017).

β -CATENINA

La β -catenina, codificada por el gen *CTNNA1* en el cromosoma 3p22.1, se identificó en un primer momento por su asociación con el dominio citoplasmático de las cadherinas y su papel en la adhesión celular calcio dependiente. Esta proteína es un componente principal en la adhesión célula-célula por su interacción con la cadherina (son proteínas de adhesión intercelular). Además, la β -catenina regula la expresión génica a través de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Fu *et al.*, 2011) (Katanaev, 2010) y tiene un papel clave en el desarrollo embrionario, en la carcinogénesis y en la EMT (MacDonald, Tamai, & He, 2009). Con la activación de Wnt, la β -catenina es traslocada desde la membrana celular (donde interactúa con la E-cadherina) al citoplasma y al núcleo, donde interactúa con factores de transcripción. Dicho con otras palabras, la β -catenina tiene en las células tanto una función de señalización, dada por una reserva citoplasmática soluble que es inestable en la ausencia de la señal de Wnt y una función de adhesión basada en la unión a E-cadherina, siendo esta una reserva estable de β -catenina en la membrana (Salim, Sjolander, & Sand-Dejmek, 2013).

La EMT de las células tumorales da lugar a la redistribución de la β -catenina desde la membrana al citoplasma (Howard, Deroo, Fujita, & Itasaki, 2011). La pérdida de expresión de β -catenina en la membrana nuclear se relaciona con un peor pronóstico en el CCR y otros cánceres (Toth *et al.*, 2012). Las mutaciones y sobreexpresión de β -catenina se han asociado con varios carcinomas. En el colon, juega un papel fundamental en la tumorigénesis, estando las mutaciones inactivadoras en el gen APC o activadoras en la β -catenina presentes en >90% de los casos de CCR y se cree que son el paso fundamental en la transformación maligna en el colon (White, Chien, & Dawson, 2012) (Figura 16). En el tiroides, se ha visto como la vía Wnt/B-

catenina tiene un papel importante en el carcinoma anaplásico y también en algunos carcinomas papilares (Sastre-Perona & Santisteban, 2012).

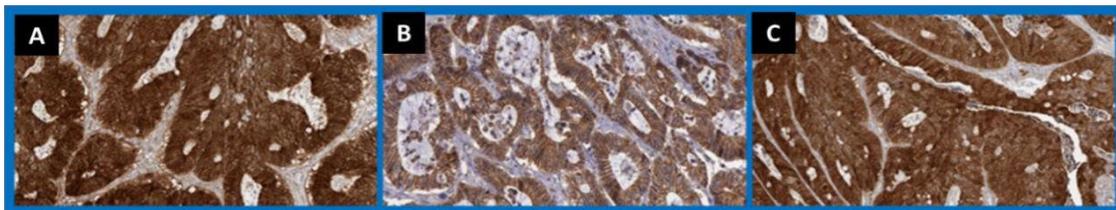


Figura 16. Inmunohistoquímica para β -catenina en el cáncer de colon. Adenocarcinomas de colon con inmunoexpresión fuerte para β -catenina citoplasmática /de membrana en $>75\%$ de las células (A, B y C) (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

En el terreno de la patología, la β -catenina suele ser de utilidad para:

- Clasificación de los diferentes subtipos de adenomas hepatocelulares y en su distinción de la hiperplasia nodular focal (Balabaud *et al.*, 2013; Bioulac-Sage *et al.*, 2012; Evason, Grenert, Ferrell, & Kakar, 2013).
- Es positiva/está mutada en la fibromatosis (Le Guellec *et al.*, 2012):
 - Diagnóstico diferencial entre la fibromatosis mesentérica (positiva con tinción nuclear debido a mutaciones en la vía APC/ β -catenina dando lugar a su acumulación nuclear) y los GIST (negativa) y la esclerosis mesentérica (Montgomery, Torbenson, Kaushal, Fisher, & Abraham, 2002).
 - Diagnóstico diferencial entre la fibromatosis (difusamente positiva o raramente tinción nuclear focal para los tumores profundos) del sarcoma fibromixoide de bajo grado y otros tumores fibroblásticos/miofibroblásticos o sarcomas (negativos para tinción nuclear) (Bhattacharya *et al.*, 2005).
 - Identificación de células tumorales aisladas en el neuroblastoma (Krishnan, Twist, Fu, & Arber, 2009).
 - Factor de mal pronóstico en el carcinoma nasofaríngeo (L. Xu *et al.*, 2013).
 - Positiva en el tumor microquístico del estroma ovárico (Maeda *et al.*, 2011).
 - Positiva en los adenomas de colon serrados (sobre todo con displasia) (Yachida, Mudali, Martin, Montgomery, & Iacobuzio-Donahue, 2009).
 - Neoplasias de colon con diferenciación de células de Paneth (Joo, Shahsafaei, & Odze, 2009).

CD138 (SINDECANO-1)

La proteína CD138 pertenece a la familia de los sindecanos, que son proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG). La palabra “sindecano” deriva de la palabra griega *sindeina* que significa “unirse” y esto refleja su papel biológico en gran parte. Los sindecanos regulan las interacciones célula a célula y célula-matriz. La familia de los sindecanos en los mamíferos está formada por 4 miembros, cada uno codificado por distintos genes. Todos los tipos celulares, excepto los eritrocitos, expresan al menos un miembro de la familia de los sindecanos. En los tejidos de los adultos, CD138 se expresa fundamentalmente en las células epiteliales y también en las células plasmáticas (Fears & Woods, 2006).

La inmunoexpresión de CD138 está alterada en un amplio abanico de enfermedades benignas de tipo inflamatorio, infeccioso, fibrótico y también en la diabetes tipo II (Palaiologou, Delladetsima, & Tiniakos, 2014). Además, CD138 está involucrado en mecanismos de carcinogénesis especialmente relacionados con la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis y la invasión tumoral y las metástasis (Al-Shibli *et al.*, 2010; Anttonen, Kajanti, Heikkila, Jalkanen, & Joensuu, 1999). Tiene un papel especial como molécula epitelial en la EMT. Su expresión, al igual que la del resto de proteínas epiteliales, disminuye cuando las células adquieren un fenotipo más mesenquimal y capacidad metastásica. Así, la pérdida de expresión de CD138 se asocia a un grado más alto y a un peor pronóstico. Este hecho se ha identificado también en estudios realizados en CCR metastásicos, donde la expresión de CD138 era significativamente menor que en los no metastásicos (Fernandez-Vega *et al.*, 2015)(Figura 17). También se ha identificado pérdida de expresión de CD138 en las células tumorales y su aumento en las células estromales y su asociación con la agresividad tumoral en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y laringe. Además, su expresión está disminuida también en los carcinomas de células escamosas invasivos (en las células tumorales) pero no en el carcinoma escamoso in situ (Mathe *et al.*, 2006; Mukunyadzi, Liu, Hanna, Suen, & Fan, 2003). Estudios recientes han demostrado que CD138 podría tener una función y actividad biológica diferente dependiendo del tipo tumoral específico. Así, por el contrario, aunque hay resultados contradictorios, está bien establecido el aumento de la expresión de CD138 en las células tumorales y su asociación con un peor pronóstico en el carcinoma de mama y en los gliomas (J. Chen *et al.*, 2017; Kind *et al.*, 2019; Qiao, Liu, Guo, Li, & Deng, 2019; Sayyad *et al.*, 2019; Y. Xu, Yuan, Zhang, Lin, & Xu, 2012). La forma soluble de CD138 se puede utilizar como un biomarcador sérico con resultados prometedores en los carcinomas del tracto respiratorio (Joensuu *et al.*, 2002). Existen anticuerpos anti CD138 en inmunoterapia con avances muy prometedores (Palaiologou, Delladetsima, & Tiniakos, 2014).

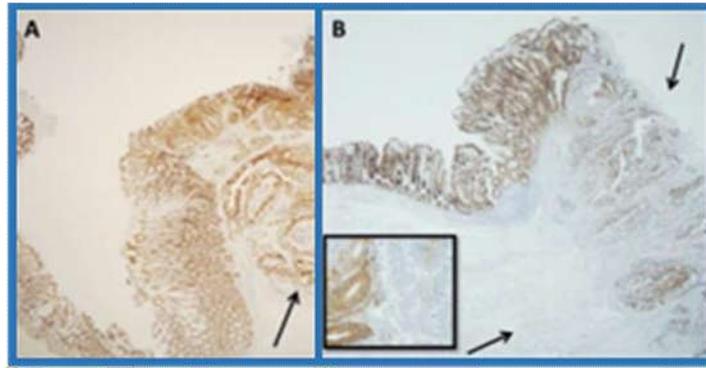


Figura 17. Inmunohistoquímica del SDC1 en adenomas colorrectales avanzados. (A, B) Localización del SDC1 usando IHQ en dos zonas de transición entre mucosa de colon no tumoral y área tumoral. (A) ACA no metastásico. La flecha marca la conservación de la tinción en la zona tumoral, 20x. (B) ACA metastásico. Las flechas así como el recuadro marcan la pérdida de tinción en el área tumoral, 20x. (Modificado de Fernandez-Vega et al., 2015).

Para los patólogos, en nuestra práctica habitual, CD138 es útil principalmente para identificar células plasmáticas y también el epitelio escamoso estratificado mediante su expresión inmunohistoquímica de membrana (Figura 18). En la patología tumoral, su positividad nos ayuda en el diagnóstico del queratoacantoma, el mieloma, el linfoma plasmablastico (positividad fuerte), el linfoma primario de cavidades y el linfoma asociado a empiema crónico. Por el contrario, es negativo en las células B maduras y otros linfomas (Huang, Chang, Gaal, & Arber, 2002; Mukunyadzi, Sanderson, Fan, & Smoller, 2002).

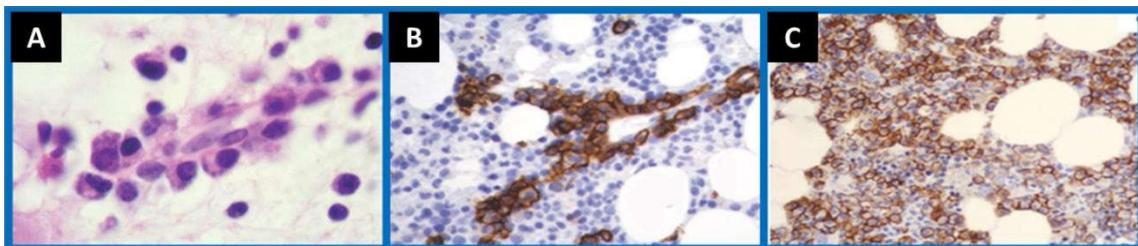


Figura 18. Inmunohistoquímica para CD138 en células plasmáticas normales y tumorales. Localización normal de las células plasmáticas es de distribución perivascular (A) que se hace evidente por medio de CD138 (B). Mieloma de células plasmáticas con CD138 (C) (Modificado de Ortiz-Hidalgo, 2017).

MOLÉCULAS MESENQUIMALES

VIMENTINA

La vimentina es una proteína de 57 kDa y 466 aminoácidos que forma parte del citoesqueleto intracelular como filamento intermedio de tipo III (los restantes son Periferina, Proteína fibrilar gliar acídica y Desmina) y es el primero de estos elementos en formarse en cualquier tipo de célula eucariota (Ridge *et al.*, 2016). La vimentina es responsable de mantener la forma celular y la integridad del citoplasma y de estabilizar las interacciones citoesqueléticas. Está también involucrada en la neurogénesis y en el transporte del colesterol y cumple funciones

de organización de otras muchas proteínas importantes en la adhesión celular, la migración y la señalización celular. Se expresa fundamentalmente en células indiferenciadas y proliferativas de origen mesenquimal y también en células totalmente diferenciadas, como células sanguíneas o células del cristalino. Su expresión está regulada por factores de crecimiento (Ferrari *et al.*, 1986). Se ha investigado ampliamente el papel de la vimentina en el crecimiento y diferenciación de diferentes sistemas, como el músculo (Olson & Capetanaki, 1989), el cristalino (Mou L, 2010) y los osteoblastos (Lian, Wang, Li, Elefteriou, & Yang, 2009) y en todos estos casos, la sobreexpresión de vimentina inhibe la diferenciación (Mou *et al.* 2010).

En los tumores, los niveles de expresión de la vimentina se han correlacionado con metástasis y un peor pronóstico en diversos cánceres como el de mama, melanoma o próstata (Cheng & Eriksson, 2017; Hol & Capetanaki, 2017) (Nagaraja *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2003). En los carcinomas de colon su expresión se observa en las células estromales y algunos estudios han relacionado esta expresión estromal con un peor pronóstico, afirmando incluso que podría tener un valor pronóstico mayor que la presencia de metástasis linfáticas e independiente de esta (Ngan *et al.*, 2007) (Figura 19).

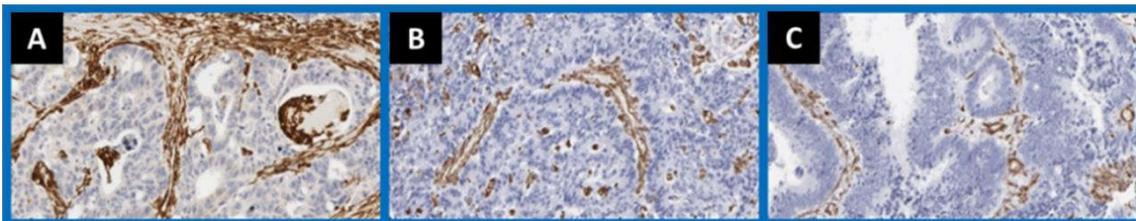


Figura 19. Inmunohistoquímica para vimentina en adenocarcinomas de colon. Tres ejemplos de adenocarcinomas de colon con tinción negativa en las células tumorales para vimentina (positividad principalmente en el estroma) (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

En la Anatomía Patológica, la utilidad fundamental de la vimentina es su uso como control de calidad del tejido para realizar técnicas de inmunohistoquímica (Thway *et al.*, 2011). También es útil en el diagnóstico diferencial entre el carcinoma renal de célula clara y otras entidades parecidas histológicamente, así como entre el adenocarcinoma endocervical y endometrial (como parte del panel inmunohistoquímico) (Kong, Beck, & Longacre, 2010). Además, la ausencia de expresión de la vimentina puede confirmar que espacios tipo grasa u otros espacios no tienen revestimiento celular (Churg *et al.*, 2011). Algunos de los tumores en los que la inmunorreactividad para vimentina es más característica son el melanoma, los tumores mesenquimales de partes blandas y de otros órganos, el carcinoma renal, carcinomas de la corteza adrenal, endometrio o tiroides, algunos del SNC como el ependimoma, el meningioma, o el pituitoma hipofisario (Phillips, Misra, Feuerstein, Kunwar, & Tihan, 2010) o el carcinoma de glándula salival análogo al carcinoma secretor de la mama (Connor, Perez-Ordóñez, Shago, Skalova, & Weinreb, 2012) (Figura 20). La tinción positiva en el carcinoma renal y en el de

endometrio está asociada a un valor pronóstico desfavorable en el caso de los carcinomas renales y favorable en los de endometrio (Sabo *et al.*, 1997). En cuanto a la positividad en el estroma, es positiva en la mayoría de los carcinomas de manera intensa (Dutsch-Wicherek, Lazar, Tomaszewska, Kazmierczak, & Wicherek, 2013; Ngan *et al.*, 2007).

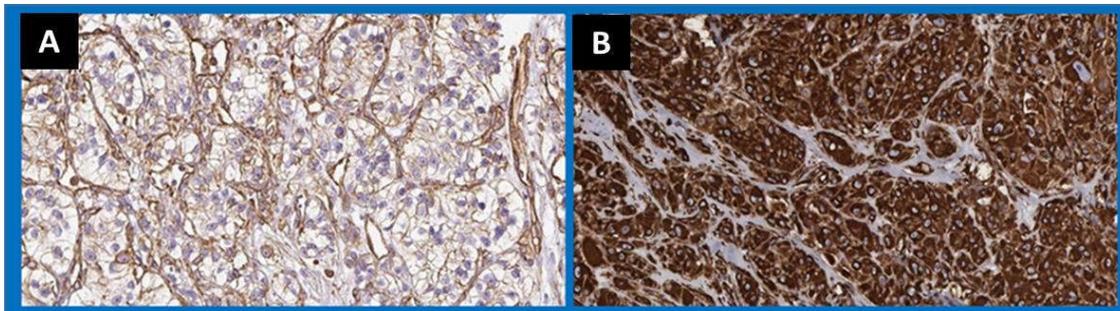


Figura 20. Inmunohistoquímica para vimentina en tumores malignos. (A) Expresión de vimentina en el carcinoma renal con tinción citoplasmática muy débil y de membrana en 25-75% de las células tumorales. (B) Expresión de vimentina en el melanoma con tinción fuerte citoplasmática y de membrana en >90% de las células (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

DESMINA

La desmina es un filamento intermedio de clase III músculo específico que fue descrito por primera vez en 1976 (Lazarides & Hubbard, 1976). Homopolímeros de esta proteína forman una red estable de filamentos intracitoplasmáticos que conectan las miofibrillas entre ellas y a la membrana plasmática. La proteína es de 53.5 kDa y consta de 470 aminoácidos (Costa, Escalera, Cataldo, Oliveira, & Mermelstein, 2004). Mutaciones en el gen que codifica la desmina se asocian con la miopatía relacionada con la desmina, con la miopatía familiar cardíaca y esquelética y con miopatías distales. El gen que la codifica es *DES*, que está presente en todos los vertebrados y la proteína codificada se expresa en el corazón y el músculo liso y esquelético de manera citoplasmática (Abraham *et al.*, 1998).

En los tumores de naturaleza epitelial habitualmente no se expresa (Figura 21) y si lo hace, está bien establecido que la desmina tiene un factor pronóstico adverso, como en el carcinoma renal en el CCR, que mediante estudios inmunohistoquímicos observaron que una expresión elevada de desmina se correlacionaba con su severidad y diferenciación y con una menor tasa de supervivencia (Y. Ma *et al.*, 2009). En efecto, diversos trabajos han mostrado cómo la desmina es un marcador altamente sensible para la diferenciación de las células endoteliales y la invasión tumoral en diversos tumores además del colon, como los tumores del estroma gastrointestinal o los sarcomas embrionarios (Dias *et al.*, 1987; Jiang *et al.*, 2008; Liegl, Hornick, Antonescu, Corless, & Fletcher, 2009).

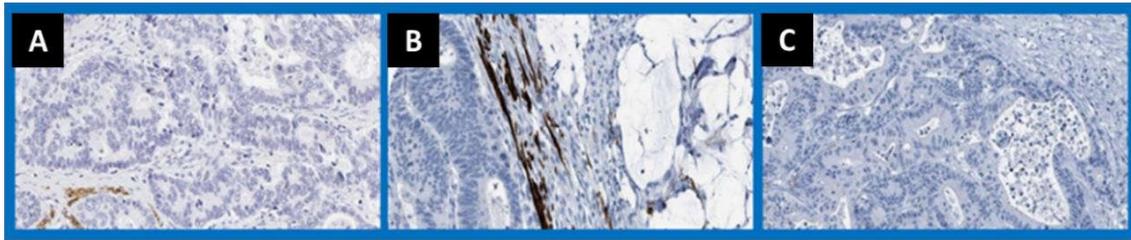


Figura 21. Inmunohistoquímica para desmina en adenocarcinomas de colon. Tres ejemplos de adenocarcinomas de colon con tinción negativa en las células tumorales para desmina (positividad focal en el estroma en A y B) (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

Para los patólogos tiene su utilidad fundamental como marcador inmunohistoquímico en paneles de marcadores mesenquimales, así como para confirmar el origen miogénico de los tejidos/tumores. Además, nos ayuda a diferenciar entre tumores de músculo liso (desmina +) y GIST (DOG-1+, c-kit/CD117 + y casi siempre desmina -) y células mesoteliales reactivas (+ en el 84% de los casos) frente a mesotelioma (+ tan sólo en el 8% de los casos) o carcinoma (+ en el 2%)(Davidson *et al.*, 2001).

ACTINA MÚSCULO LISO

La actina de músculo liso (AML) está codificada por el gen *ACTA2*. Este gen, localizado en el cromosoma 10q23.31, codifica una de las 6 proteínas diferentes de actina. Las actinas son proteínas altamente conservadas que están involucradas en la movilidad celular, en la estructura, integridad y señalización intercelular. La proteína codificada por este gen es una AML que está involucrada en la contractibilidad cardíaca y en la homeostasis de la tensión sanguínea. Mutaciones en este gen causan variedad de enfermedades vasculares, como enfermedades de la aorta torácica, enfermedad arterial coronaria, ictus o la enfermedad de Moyamoya, así como el síndrome de disfunción multisistémica de músculo liso (D. C. Guo *et al.*, 2009). El anticuerpo contra esta proteína fue descubierto en 1986 (Skalli *et al.*, 1986).

En los tumores, se expresa sobre todo en los sarcomas (Roholl, Elbers, Prinsen, Claessens, & van Unnik, 1990). Se ha descrito que la actina se comporta como factor de mal pronóstico en el carcinoma renal, al igual que la desmina. En cuanto a su expresión en el CCR, normalmente negativa en las células tumorales, como en casi todos los carcinomas, se ha visto como existe una proporción significativamente mayor de células positivas en los CCR que en el tejido colorrectal normal (Figura 22). Esto se correlacionó con la expresión negativa de E-cadherina. Además, la mayoría de las células AML positivas estaban en fase proliferativa. Durante la progresión tumoral, la aparición de una tinción dot-like de AML en las células positivas para citoqueratina podría indicar la fase inicial de la EMT. Así, la correlación negativa entre la expresión de E-cadherina y

las células que sobreexpresan actina apoya el hecho de que la EMT se lleva a cabo mediante la pérdida de contacto entre las células epiteliales (pérdida de marcadores epiteliales y ganancia de marcadores mesenquimales) (Valcz *et al.*, 2012).

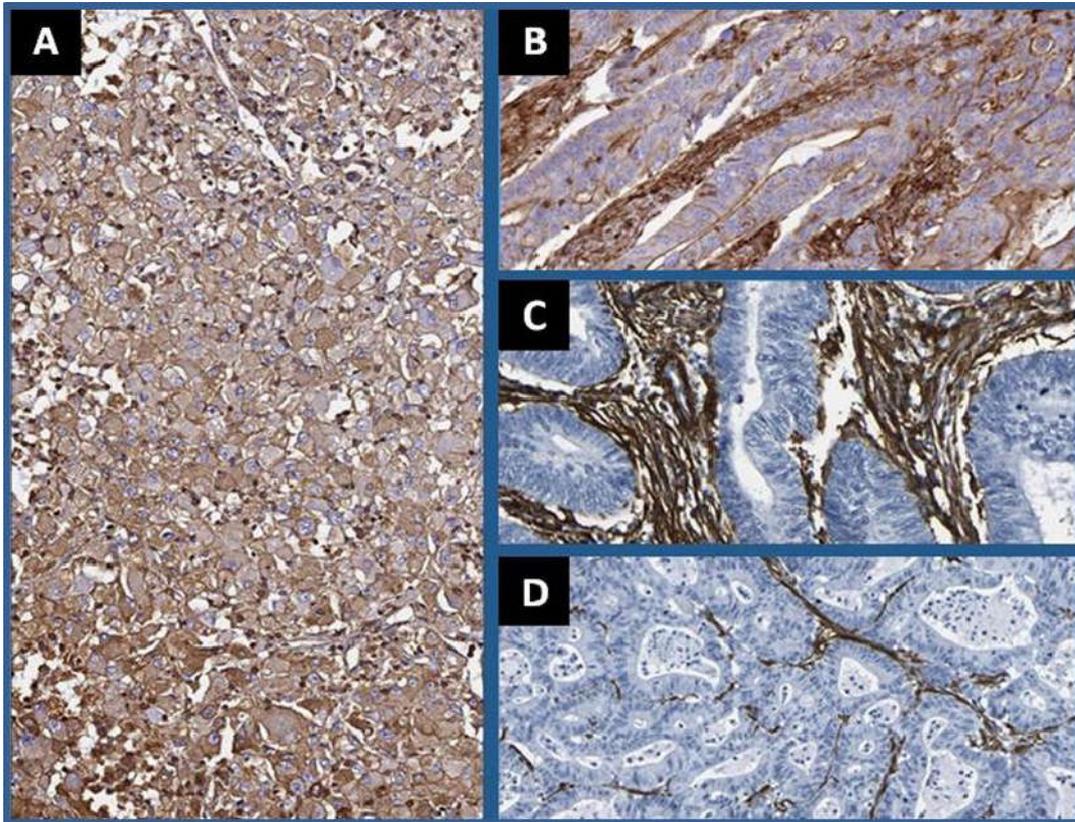


Figura 22. Inmunohistoquímica para actina de músculo liso en tumores malignos. (A). Carcinoma renal con tinción moderada citoplasmática/de membrana en >75 % de las células. (B)CCR con tinción fuerte citoplasmática/de membrana en 25-75% de las células. (C-D) CCR con tinción negativa en las células tumorales (positivo en el estroma) (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

Para los patólogos, su expresión inmunohistoquímica con una tinción citoplasmática o de membrana es de utilidad como marcador de células de músculo liso y miofibroblastos en tejidos normales, reactivos (Jones, Jacobson, & Steudel, 1999) o neoplásicos (Perez-Montiel, Plaza, Dominguez-Malagon, & Suster, 2006). Es importante también para identificar células mioepiteliales en tejidos normales o neoplásicos de la mama, las glándulas sudoríparas o salivales, para descartar invasión y puede ser especialmente importante en muestras de citología (Khalifeh *et al.*, 2008; S. Sato *et al.*, 2003). En lesiones papilares de mama es más útil p63 que la AML porque ésta última también tiñe las células estromales (Tse *et al.*, 2007). Por otro lado, la ausencia de expresión en los vasos sanguíneos, que indicaría la falta de pericitos, nos indica que se trata de vasos más inmaduros y por tanto más susceptibles de ser invadidos por el tumor, indicando un mayor riesgo de metástasis (Yonenaga *et al.*, 2005). Por último, tiene su papel en el diagnóstico

diferencial entre tumores desmoides pleuropulmonares (AML positivo) y tumores fibrosos solitarios (AML negativo) junto con otros marcadores (Andino *et al.*, 2006).

2 RESULTADOS

ANÁLISIS DE LOS MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO – MESÉNQUIMA

Durante la EMT, las células basales epiteliales pierden su “fenotipo epitelial”, incluyendo sus adhesiones laterales célula a célula y las adhesiones célula-matriz a la membrana basal, dando lugar a una pérdida de la polaridad apical-basal. Las células pierden marcadores epiteliales como la E-cadherina y aumentan la expresión de otros como la vimentina, adquiriendo un “fenotipo más mesenquimal”. Entre los principales marcadores epiteliales se encuentran la E-cadherina, la β -catenina y el sindecano-1 o CD138. Así, La E-cadherina, es una molécula de adhesión célula a célula que tiene un papel muy importante en la tumorigénesis en la EMT como ya se ha descrito en este trabajo ampliamente. Su expresión inmunohistoquímica tiene un patrón de tinción de membrana. La β -catenina es un componente principal en la adhesión célula – célula por su interacción con la E-cadherina. Cuando se expresa inmunohistoquímicamente de manera patológica, se expresa de manera nuclear en los fibroblastos y con una tinción nuclear o citoplasmática en las células epiteliales. Al igual que la E-cadherina, juega un papel muy importante en la EMT. El sindecano-1 o CD138 es otra molécula importante en el proceso de la EMT. En los tejidos de los adultos, CD138 se expresa fundamentalmente en las células epiteliales y en las células plasmáticas. Su inmunoexpresión se identifica mediante una tinción de membrana. Los resultados globales de los análisis de inmunoexpresión de estas moléculas se muestran en la tabla 8 y en la figura 23.

Tabla 8. Análisis de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas estudiadas de EMT. Se comparan las medias de los resultados en función de los tumores primarios y sus respectivas metástasis.

Marcadores	Score (0-300 puntos)		p- valor
	Tumores primarios	Metástasis hepáticas	
E-cadherina	295,9±15,5	249,8±18,7	p<0,001
β-catenina	255,1±71,4	190,0±72,1	p<0,001
CD138	82,8±27,7	70,4±24,3	p= 0,385
Vimentina	0	0	-
Desmina	0	0	-
Actina de músculo liso	0	0	-

*En negrita se representan los datos con significación estadística p<0,05.

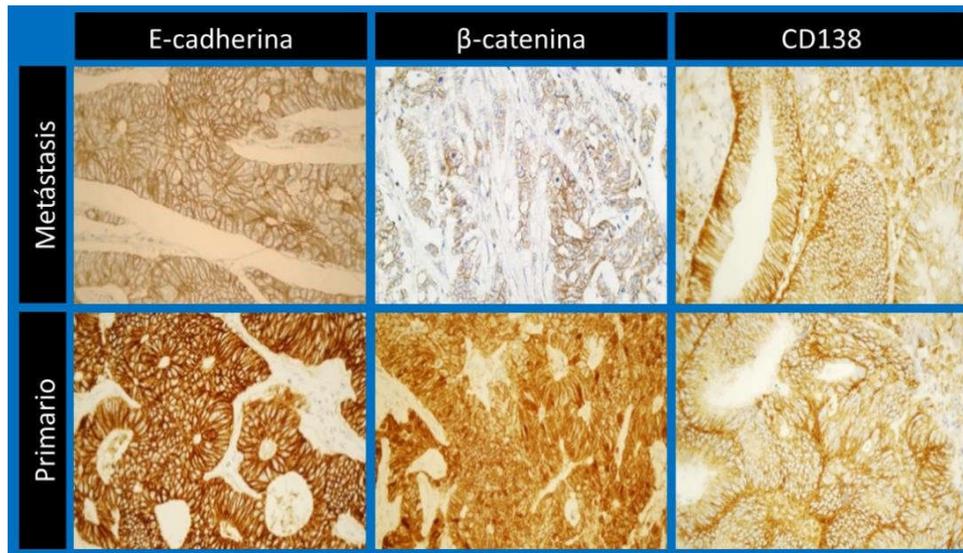


Figura 23. Expresión inmunohistoquímica de los marcadores epiteliales. (E-cadherina, β -catenina y CD138). Se aprecia una pérdida de expresión E-cadherina y β -catenina en las metástasis con respecto a los adenocarcinomas primarios de colon, conservándose la expresión de CD138.

Hemos identificado una subexpresión significativa de E-cadherina ($295,9 \pm 15,5$ vs $249,8 \pm 18,7$; $p < 0.001$) en el adenocarcinoma metastásico hepático, con respecto a la expresión en el primario de colon. Así, la mayor parte de los tumores primarios mostraron una expresión cercana a 300 puntos, siendo la expresión más baja de 225 puntos. A pesar de la subexpresión de E-cadherina en los adenocarcinomas metastásicos, 20 de estos casos muestran una expresión de 300 puntos, 17 casos no muestran subexpresión y un caso de los metastásicos muestra sobreexpresión respecto al primario. La expresión más baja correspondió a un caso con 60 puntos seguido de otro caso con 120 puntos.

Con respecto a la β -catenina, se ha identificado una subexpresión significativa en el adenocarcinoma metastásico hepático, con respecto a la expresión en el primario de colon ($255,1 \pm 71,4$ vs $190,0 \pm 72,1$; $p < 0.001$). En este caso, también la mayoría de tumores primarios mostraron una expresión cercana a los 300 puntos. Se detectaron 3 casos primarios con una expresión llamativamente baja, uno con una expresión de 30 puntos y los otros dos de 90 puntos. En 8 casos correspondientes a metástasis se observó sobreexpresión respecto al primario, observando un caso con expresión total de 300 puntos tanto para el tumor primario como para su metástasis hepática. 7 casos de metástasis mostraron una expresión menor a 100 puntos, siendo la expresión de los dos casos más bajos de 30 y 40 puntos.

En nuestro estudio, no se observan alteraciones estadísticamente significativas para el Síndecano-1 entre los adenocarcinomas primarios y sus metástasis. La expresión fue muy

variable, observando cuatro casos que no expresaron CD138 en el tumor primario, dos de los cuales tampoco la expresaron en su metástasis hepática.

No se identifica expresión en las células tumorales de ningún marcador mesenquimal en las muestras de adenocarcinoma, ni en los primarios ni en sus metástasis (Figura 24).

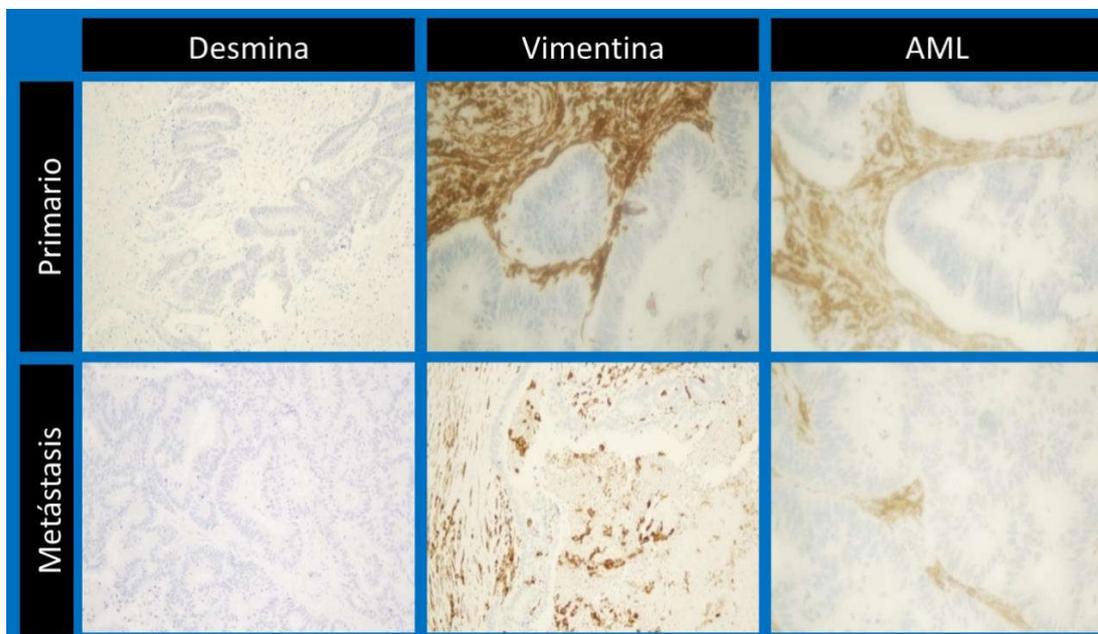


Figura 24. Expresión inmunohistoquímica de los marcadores mesenquimales. (Desmina, Vimentina, AML). Expresión negativa en las células epiteliales. Expresión positiva de vimentina y AML en las células estromales.

ESTUDIOS DE CORRELACIÓN ESTADÍSTICA

Los datos obtenidos tras la realización del test de correlación de Spearman se representan en la Tabla 9. Cabe destacar la presencia de varias correlaciones de interés, especialmente positiva para la expresión de β -catenina y E-cadherina en las metástasis y de carácter débil-moderado ($r=0,305$; $p=0,044$) y de β -catenina y Sindecano-1 en las metástasis, también positiva y moderada ($r=0,400$; $p=0,009$). Por otra parte, se han identificado tendencias a la significación estadística entre la expresión de β -catenina y E-cadherina en los tumores primarios ($r=0,270$; $p=0,084$) y entre la expresión de β -catenina en las metástasis y E-cadherina en los tumores primarios ($r=0,268$; $p=0,091$), ambos de carácter débil.

Tabla 9. Análisis de la correlación entre variables moleculares. Se comparan los resultados de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas de EMT, a nivel del tumor primario y las metástasis.

	E-cadherina primarios	E-cadherina metástasis	β -catenina primarios	β -catenina metástasis	CD138 primarios
E-cadherina metástasis	r= 0,155 p= 0,340				
β -catenina primarios	r= 0,270 p= 0,084	r= 0,167 p= 0,297			
β -catenina metástasis	r= 0,268 p= 0,091	r= 0,305 p= 0,044	r= 0,083 p= 0,601		
CD138 primarios	r= 0,061 p= 0,709	r= 0,086 p= 0,602	r= 0,040 p= 0,979	r= 0,133 p= 0,413	
CD138 metástasis	r= 0,254 p= 0,129	r= 0,099 p= 0,538	r= 0,014 p= 0,934	r= 0,400 p= 0,009	r= 0,248 p= 0,145

*En negrita se representan los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

A continuación, describimos las principales correlaciones que hemos identificado entre los resultados cuantitativos de la inmunoexpresión de las moléculas epiteliales de EMT analizadas en este estudio y las principales variables cuantitativas del modelo (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de la correlación entre variables clínicas, patológicas y moleculares. Se compara los resultados de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas estudiadas, tanto a nivel del tumor primario como de la metástasis, con las principales variables cuantitativas del modelo.

	Edad	SG	TLE	SPM	Tamaño tumoral	Ganglios positivos	Mitosis primario	Mitosis metástasis
E-cadherina primarios	r= 0,040 p= 0,797	r= -0,117 p= 0,448	r= -0,021 p= 0,890	r= -0,051 p= 0,744	r= 0,037 p= 0,016	r= -0,271 p= 0,082	r= -0,094 p= 0,580	r= 0,109 p= 0,513
E-cadherina metástasis	r= 0,030 p= 0,844	r= 0,043 p= 0,780	r= 0,188 p= 0,221	r= -0,069 p= 0,655	r= -0,043 p= 0,783	r= -0,169 p= 0,284	r= -0,068 p= 0,684	r= 0,017 p= 0,916
β -catenina primarios	r= 0,074 p= 0,628	r= -0,067 p= 0,660	r= 0,036 p= 0,914	r= -0,086 p= 0,576	r= 0,211 p= 0,168	r= -0,402 p= 0,007	r= 0,016 p= 0,922	r= 0,018 p= 0,913
β -catenina metástasis	r= 0,065 p= 0,673	r= 0,081 p= 0,595	r= 0,091 p= 0,554	r= 0,002 p= 0,988	r= 0,059 p= 0,701	r= -0,546 p < 0,001	r= -0,023 p= 0,888	r= -0,213 p= 0,187
CD138 primarios	r= 0,291 p= 0,071	r= 0,244 p= 0,120	r= 0,155 p= 0,327	r= 0,110 p= 0,488	r= -0,021 p= 0,897	r= 0,050 p= 0,759	r= 0,209 p= 0,215	r= -0,239 p= 0,155
CD138 metástasis	r= 0,132 p= 0,409	r= -0,127 p= 0,430	r= -0,178 p= 0,264	r= -0,055 p= 0,731	r= -0,115 p= 0,478	r= -0,067 p= 0,684	r= -0,083 p= 0,634	r= -0,059 p= 0,727

*En negrita se representan los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$).SG: supervivencia global; TLE: tiempo libre de enfermedad; SPM: supervivencia postmetástasis;

Se han observado correlaciones estadísticamente significativas de interés tales como la existente entre la expresión de E-cadherina en los tumores primarios y el tamaño del tumor, con una intensidad leve ($r = 0,037$; $p = 0,016$); una correlación inversa entre la expresión de β -catenina en los primarios y el número de ganglios positivos ($r = -0,402$; $p = 0,007$); y entre la expresión de β -catenina en las metástasis y el número de ganglios positivos ($r = -0,546$; $p < 0,001$). Por otra parte,

se ha observado una tendencia a la significación de manera invertida entre la expresión de E-cadherina en los tumores primarios y el número de ganglios positivos ($r = -0,271$; $p = 0,082$); así como entre la expresión de CD138 en los tumores primarios y la edad ($r = 0,132$; $p = 0,409$).

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIAS

El análisis de supervivencias puso de manifiesto que una expresión de β -catenina >150 puntos valorada en los tumores metastásicos seleccionaba significativamente un grupo de pacientes con mejor SG, TLE y SPM (Figura 25). No se encontraron datos con relevancia estadística en términos de supervivencia para el resto de moléculas de EMT estudiadas.

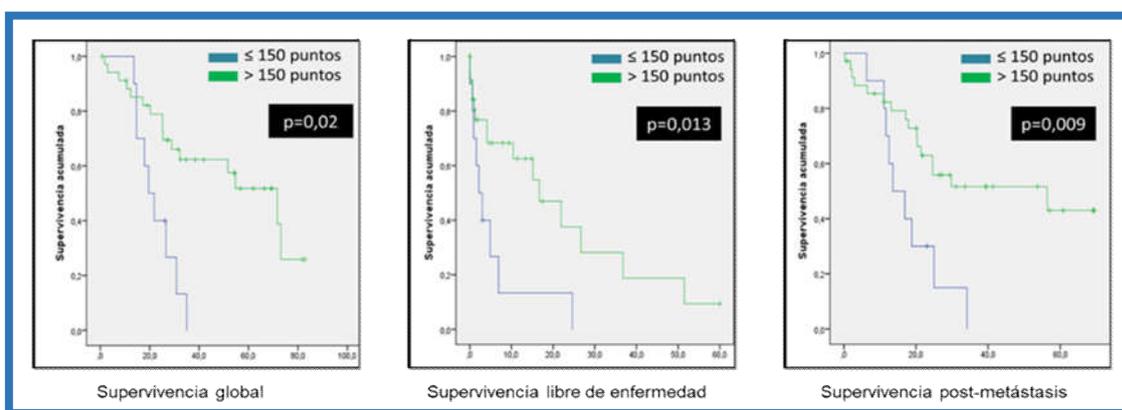


Figura 25. Análisis de supervivencia para β -catenina. Curvas de supervivencia en meses que muestran como una expresión mayor de 150 puntos para β -catenina medido en las metástasis segrega un grupo de pacientes con mejor SG, TLE y SPM.

3 DISCUSIÓN

Dada la importancia de la EMT en la tumorigénesis y diseminación del cáncer, hemos prestado especial atención a estas moléculas clave en nuestro modelo de metástasis de adenocarcinomas de colon a hígado. En primer lugar, discutiremos nuestros hallazgos relativos a las moléculas epiteliales y posteriormente las mesenquimales.

MOLÉCULAS EPITELIALES

En relación a la molécula E-cadherina, aunque hay trabajos contradictorios que desarrollaremos a continuación, la mayoría de los estudios previos mostraron también una subexpresión mantenida en las metástasis respecto a los primarios, así como la relación de dicha subexpresión con la dediferenciación del adenocarcinoma de colon (Dorudi, Sheffield,

Poulsom, Northover, & Hart, 1993; Palaghia *et al.*, 2016; Tsanou, Peschos, Batistatou, Charalabopoulos, & Charalabopoulos, 2008). Y es que la EMT está relacionada con la progresión tumoral, la invasión y las metástasis en el CCR y también en otros cánceres de naturaleza epitelial, de modo que los tumores pierden sus marcadores epiteliales durante el proceso de metástasis, adquiriendo un fenotipo más mesenquimal (Yun *et al.*, 2014). Así, trabajos previos describen que una expresión reducida de E-cadherina en los tumores primarios está directamente relacionada con la frecuencia de las metástasis linfáticas y hepáticas (Hiscox & Jiang, 1997; Kitadai *et al.*, 1996). Sin embargo, autores como Kim *et al.* observaron en un estudio cómo la subexpresión de E-cadherina está significativamente asociada con el crecimiento tumoral y un estadio de la AJCC pN más alto independientemente de otras variables clínicas, patológicas o moleculares, pero no con metástasis a órganos a distancia ni con un aumento de la mortalidad por CCR específica (S. A. Kim *et al.*, 2016). Resulta de interés comentar como un estudio previo dividió una serie de carcinomas en tres grupos, teniendo en cuenta la expresión combinada aberrante de E-cadherina, β -catenina y α -catenina, observando como la incidencia de metástasis aumentaba de manera inversamente proporcional a la expresión de dichas moléculas (Ikeguchi, Makino, & Kaibara, 2001). Además, la presencia de aberraciones concurrentes de las tres moléculas se relacionó también con una supervivencia más corta. Un hallazgo obtenido por este grupo que también está en la línea de nuestros resultados fue que observaron cómo disminuía la expresión de estas moléculas de adhesión de los tumores primarios con sus metastásicos, apreciando solamente un 43% de expresión en las metástasis linfáticas y un 46% en las metástasis hepáticas. Por otro parte, hay estudios que no demuestran ninguna relación entre la expresión disminuida de E-cadherina con el estadio, la diferenciación tumoral, el potencial metastásico o el pronóstico para el CCR (Kitadai *et al.*, 1996).

La invasión y diseminación de los carcinomas bien diferenciados está asociada a menudo con la pérdida de diferenciación epitelial y la ganancia de capacidades mesenquimales por parte de las células tumorales en el frente de invasión. Sin embargo, cuando comparamos las áreas centrales de los CCR y las correspondientes metástasis encontramos de nuevo los mismos patrones de crecimiento de diferenciación epitelial. Estos característicos cambios fenotípicos están asociados con diferentes patrones de expresión de β -catenina, la principal proteína oncogénica en los CCR, y E-cadherina. Se puede encontrar expresión de β -catenina en células mesenquimales desdiferenciadas en el frente de invasión, pero, de manera llamativa, en los tumores primarios a veces también se encuentra en las áreas centrales, tanto a nivel de la membrana celular como en el citoplasma de las células tumorales malignas epiteliales. Este patrón de expresión se acompaña de cambios en la expresión de E-cadherina y la actividad proliferativa. En base a estos datos, se sugiere que una fuerza importante de progresión del CCR es sin duda la transición fenotípica de sus células modulando entre otras moléculas la distribución intracelular

de β -catenina en las células tumorales (Palmqvist, Rutegard, Bozoky, Landberg, & Stenling, 2000; Thomas Brabletz, 2001). Así, el complejo β -Catenina/E-cadherina juega un papel muy importante en la adhesión célula a célula haciendo que los niveles bajos de estas moléculas se asocien a mayor invasividad tumoral y mayor riesgo de metástasis (Datta, 2017; Kudo *et al.*, 2004). No obstante, previos estudios vieron cómo la reducción de la expresión de β -catenina y la sobreexpresión de otra molécula denominada PPAR- α se correlacionó fuertemente con una marcada infiltración de macrófagos asociados a tumor, presencia de metástasis hepáticas y tiempo de supervivencia muy corto. Estos resultados sugieren que este patrón de expresión de dichas moléculas podría tener un papel clave en la agresividad del CCR (Massimo Pancione BSc, 2009).

En relación al sindecano-1 o CD138, la última de las moléculas epiteliales que hemos estudiado, es un HSPG involucrado en vías moleculares que habitualmente están disreguladas durante los procesos de carcinogénesis, especialmente vinculada a la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis, la invasión tumoral y las metástasis. Su expresión en las células tumorales epiteliales y en ocasiones el estroma de dichos tumores se ve modificada en varios tipos de cánceres y frecuentemente relacionada con el pronóstico de los pacientes (Palaiologou *et al.*, 2014). En el CCR, así como en la displasia de alto grado, la expresión de CD138 se reduce respecto al epitelio normal (Day *et al.*, 1999; Fujiya *et al.*, 2001; Hashimoto, Skacel, & Adams, 2008; Lundin *et al.*, 2005). Además, la expresión reducida de la proteína se asoció a un grado histológico alto, estadio avanzado (Hashimoto *et al.*, 2008; Lundin *et al.*, 2005), metástasis linfáticas (Fujiya *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2008) y es un factor pronóstico independiente de peor supervivencia (Fujiya *et al.*, 2001). Así, la pérdida de expresión de CD138 se asocia a un grado más alto y a un peor pronóstico. Este hecho se ha identificado también en estudios realizados en CCR metastásicos, donde la expresión de CD138 era significativamente menor que en los no metastásicos (Fernandez-Vega *et al.*, 2015).

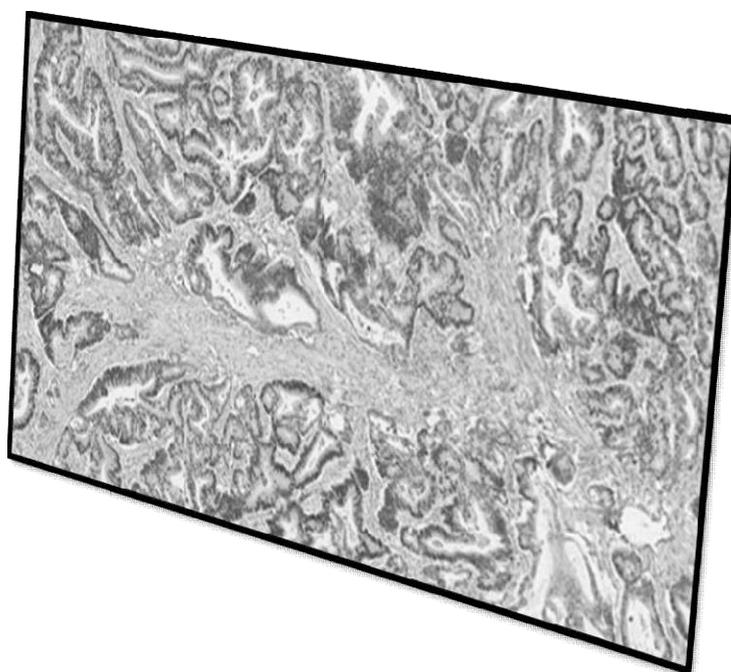
MOLÉCULAS MESENQUIMALES

Las moléculas mesenquimales que hemos estudiado en nuestro modelo tales como la vimentina, desmina y AML, se expresan inmunohistoquímicamente de manera general como corresponde en el estroma de los tumores epiteliales y no en las células tumorales epiteliales propiamente dichas (Meyer *et al.*, 2019). Así, varios trabajos previos han observado como en el CCR la vimentina se expresa específicamente en el estroma pero no en las células tumorales epiteliales (Sordat *et al.*, 2000; von Bassewitz, Roessner, & Grundmann, 1982). Algunas excepciones para la vimentina serían la expresión en el carcinoma renal (Ingels *et al.*, 2017) o en el carcinoma endometrial, donde es útil en el diagnóstico diferencial con el adenocarcinoma endocervical (Stolnicu *et al.*, 2018). En nuestro estudio hemos observado resultados similares a los previamente descritos en la literatura, es decir, sin apreciar ninguna expresión en las células tumorales y sí en el estroma. No obstante, previos trabajos sugieren que la expresión de vimentina en las células estromales puede estar relacionada con un peor pronóstico en el CCR (Ngan *et al.*, 2007), ya que el propio microambiente tumoral tiene un papel muy importante en la progresión tumoral (Bissell & Radisky, 2001). Como hemos descrito previamente en la introducción de esta molécula, la vimentina se expresa de manera ubicua en células de origen mesenquimal como los fibroblastos, las células endoteliales, células de músculo liso y un largo etcétera (Mor-Vaknin, Punturieri, Sitwala, & Markovitz, 2003). En algunos carcinomas como el de mama o el melanoma, la vimentina está sobreexpresada en fenotipos agresivos durante el fenómeno de EMT (Brabletz *et al.*, 2005). Ngan *et al.*, encontraron que la expresión de vimentina en el estroma podría separar un grupo de pacientes con un peor pronóstico, argumentando su posible papel favorecedor en el aumento de los microvasos necesario para el crecimiento y desarrollo del tumor. Sin embargo, en el CCR la relación entre la densidad de microvasos y el pronóstico es variable, habiéndose descrito correlaciones positivas pero también negativas (Neal *et al.*, 2006). También observaron que el valor pronóstico de la expresión estromal de vimentina era mayor que el del número de ganglios linfáticos positivos e incluso superior al grado de diferenciación histológica. Estos resultados sostienen que la terapia dirigida al estroma podría tener su papel en el CCR (Liotta & Kohn, 2001).

Finalmente, se ha descrito que la presencia de vasos inmaduros en el microambiente tumoral del CCR pueden ser más fácilmente atravesados por el tumor y por tanto favorecer las metástasis y su relación con un peor pronóstico de dichos pacientes. Así, esta inmadurez de los vasos se traduce en la ausencia de pericitos AML positivos. Por lo tanto, se concluye que no sólo la densidad tumoral si no también la madurez de dicha vasculatura son factores cruciales para el desenlace de los pacientes con CCR (Imamura, 2005).

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE OTRAS MOLÉCULAS CON IMPORTANCIA PRONÓSTICA



1 INTRODUCCIÓN

A continuación, describiremos brevemente otras moléculas de conocido interés pronóstico de las que en su mayoría disponemos en nuestro laboratorio de Anatomía Patológica del HUCA y para las que hemos determinado en nuestro modelo de trabajo sobre pacientes con adenocarcinomas metastatizantes, tanto en los tumores primarios como en las propias metástasis hepáticas.

QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL

La quinasa de adhesión focal (FAK), codificada por el gen *FAK/PTK2*, localizado en el locus 8q24, es una molécula con actividad tirosin quinasa no receptora que regula diversas funciones celulares, siendo clave en la adhesión celular, migración, invasión, polaridad, proliferación y supervivencia (Canel *et al.*, 2017; Kleinschmidt & Schlaepfer, 2017; Munguia-Calzada *et al.*, 2019; Panera, Crudele, Romito, Gnani, & Alisi, 2017).

La expresión y/o actividad incrementada de FAK en los tumores se ha asociado con una mayor invasividad y agresividad de los mismos (Chatzizacharias *et al.*, 2011; Choi, Kim, Sohn, Lee, & Kim, 2015). Consecuentemente, FAK constituye un regulador clave de múltiples procesos biológicos que pueden tener un impacto importante en el fenotipo maligno de los tumores (Serrels *et al.*, 2012). Se ha visto que regula la progresión y las metástasis de diversos tumores como el cáncer de mama, tiroides, ovario, melanoma, cabeza y cuello, el CHC, el CCR o el gástrico (Golubovskaya, Kweh, & Cance, 2009; Lai *et al.*, 2010; H. G. Yu *et al.*, 2006). Particularmente, la sobreexpresión de FAK se ha asociado tanto con los adenocarcinomas primarios de colon como con sus metástasis hepáticas en diversos estudios clínicos, sugiriendo que FAK está involucrada en el desarrollo del CCR y sus metástasis (de Heer, Koudijs, *et al.*, 2008; Fu, Hall, & Schaller, 2012). Debido a esto, la inhibición de FAK evita la angiogénesis, la cual es esencial para el crecimiento del cáncer invasivo y las metástasis (Schultze & Fiedler, 2010; Sulzmaier, Jean, & Schlaepfer, 2014). De manera alternativa, la autofosforilación de FAK en el aminoácido tirosina 397 contribuye a la progresión maligna del CCR (H. G. Yu *et al.*, 2006). Recientemente, se ha publicado que la sobreexpresión de FAK también es un factor de mal pronóstico en el carcinoma de células escamosas cutáneo, resultando un predictor independiente de metástasis linfáticas que podría ser útil para la estratificación del riesgo y el manejo de los pacientes con estos carcinomas. (Munguia-Calzada *et al.*, 2019). La mayoría de las células tumorales en casi todos los tumores muestran una inmunoreactividad citoplasmática débil o moderada (Figura 26).

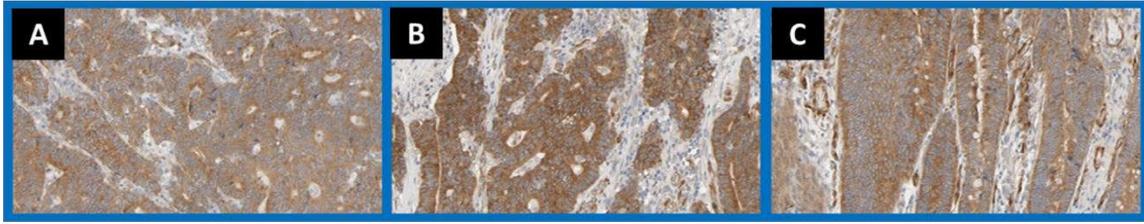


Figura 26. Inmunoexpresión de FAK en adenocarcinomas de colon con tinción moderada citoplasmática/ de membrana en >75% de las células (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

STAT6

Esta proteína, codificada por el gen que lleva su mismo nombre, localizado en el cromosoma 12, es un miembro de la familia de factores transcripcionales STAT. En respuesta a citoquinas y factores de crecimiento, los miembros de la familia STAT son fosforilados por los receptores asociados a quinasas y después forman homo y heterodímeros que se traslocan al núcleo celular donde actúan como factores de transcripción. Esta proteína juega un papel fundamental en realizar respuestas biológicas mediadas por IL-4. Induce la expresión de BCL2 L1/BCL-X(L), que es responsable de la actividad antiapoptótica de IL-4. Otra de sus funciones es la diferenciación de los linfocitos T helper 2 (Th2), la expresión de marcadores de superficie y el cambio de clase de las inmunoglobulinas (Goenka & Kaplan, 2011).

Se ha visto que STAT6 está amplificado en un subgrupo de liposarcomas dediferenciados, dando lugar a la expresión inmunohistoquímica, lo que podría generar problemas en el diagnóstico diferencial entre el tumor fibroso solitario y el liposarcoma dediferenciado (Doyle, Tao, & Marino-Enriquez, 2014). Además, en un estudio realizado por Doyle y colaboradores (Doyle, Vivero, Fletcher, Mertens, & Hornick, 2014), se observó expresión inmunohistoquímica en un histiocitoma fibroso profundo, de manera débil. Otros tumores donde se ha detectado expresión inmunohistoquímica por esta proteína recientemente son el carcinoma basocelular (Slawinska *et al.*, 2019) y el carcinoma de célula no pequeña de pulmón, fundamentalmente en carcinomas escamosos. En el CCR, se ha observado una correlación entre la inmunoexpresión fundamentalmente citoplasmática de STAT6 en CCR (traslocación al citoplasma) y el estadio patológico, las metástasis linfáticas y a distancia, y por tanto con un peor pronóstico, sugiriendo que STAT6 podría jugar un papel importante en la progresión del cáncer (C. G. Wang *et al.*, 2010) (Figura 27).

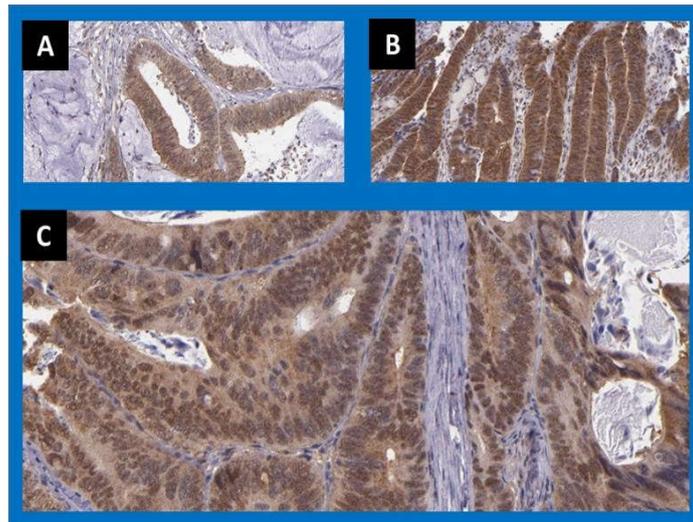


Figura 27. Inmunoeexpresión de STAT6 en adenocarcinomas de colon. (A) tinción citoplasmática/de membrana nuclear de intensidad moderada en > 75% de las células tumorales (B) tinción citoplasmática/de membrana nuclear de intensidad moderada en 75-25% de las células tumorales (C) tinción citoplasmática/de membrana nuclear de intensidad moderada en 75-25 % de las células tumorales (obtenido de The Human Protein Atlas *website*).

Dentro de el área de la Anatomía Patológica, STAT6 juega su papel fundamental en el diagnóstico del tumor fibroso solitario de cualquier localización, siendo en este tumor positivo de manera nuclear en prácticamente todos los casos, con una sensibilidad de entre el 98 y el 100% y una especificidad muy cercana al 100% (Schweizer *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2014). De esta manera, nos resulta una herramienta muy útil en el diagnóstico diferencial de el tumor fibroso solitario con otros tumores de morfología similar (Cheah *et al.*, 2014; Doyle, Vivero, *et al.*, 2014) (Figura 28).

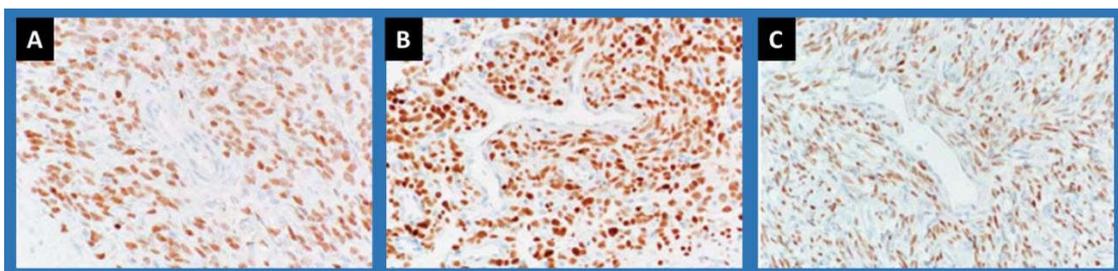


Figura 28. Inmunoeexpresión de STAT 6 en tumor fibroso solitario en TFS maligno (A y B); TFS celular (C) (Doyle, Vivero, et al., 2014).

COX-2

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima clave en la síntesis de las prostaglandinas, a través de la oxidación del ácido araquidónico. Aunque ambas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) tienen similar afinidad por el ácido araquidónico y son homólogas en un 61%, presentan diferente afinidad por el sustrato y se encuentran en distintos lugares dentro de la célula. También hay

diferencias en los genes que codifican las dos enzimas. A la COX-2 se la conoce como forma inducible y a la COX-1 como forma constitutiva. La COX-2 tiene un gen de menor tamaño, localizado en el cromosoma 1, mide 8,3 kb y contiene 10 exones. Su región promotora tiene lugares de ligadura que se sabe que reconocen a los glucocorticoides, a la IL -6 y a otras citoquinas (Hla & Neilson, 1992). En la célula, COX-2 se encuentra fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear (Crofford, 1997). Su aparición en las células puede ser estimulada por una respuesta inflamatoria, aunque estudios recientes han demostrado que se expresa constitutivamente en diferentes puntos del aparato genital masculino y femenino y durante los procesos relacionados con la ovulación, la implantación ovular, la inducción del parto y la reproducción, así como en diferentes tipos de neuronas. Así, COX-2 está regulada principalmente por mitógenos, promotores tumorales, citoquinas, ácidos grasos libres, suero, AINE e inhibidores de COX-2 específicos (Crofford, 1997).

La proliferación celular es la base del desarrollo tumoral y las ciclooxigenasas (COXs) son unas de las principales enzimas que lo regulan. Juegan un papel importante en el desarrollo de el tejido metaplásico y displásico así como en el desarrollo y progresión del cáncer (Bengi *et al.*, 2015). Su papel fisiopatológico está descrito no sólo en la carcinogénesis sino también en la inflamación, y en procesos de curación o reparativos (Albasri, Elkablawy, Hussainy, Yousif, & Alhujaily, 2018). Así, COX-2 se puede expresar inmunohistoquímicamente en muchos tumores malignos, como en los de mama, hígado, ovario, pulmón, tiroides, próstata, piel, esófago, estómago, colon o páncreas (Almeida *et al.*, 2012; Enache *et al.*, 2018; F. Xu *et al.*, 2017). Se ha visto una asociación entre la expresión inmunohistoquímica de COX-2 y un peor pronóstico en los carcinomas de pulmón de célula no pequeña en estadio I y II (Laga, Zander, & Cagle, 2005), así como una posible relación entre su expresión y un peor comportamiento clínico en el carcinoma folicular de tiroides (Haynik & Prayson, 2005). En el CCR, COX-2 se expresa de manera citoplasmática en un 80-90% de los casos, en un 40-50 % de adenomas premalignos y no se expresa por línea general en el colon normal (Bengi *et al.*, 2015). Esto apoya que COX-2 podría tener un papel en la patogénesis del CCR (Nosho *et al.*, 2004). Se ha visto además que los tumores con una elevada expresión de COX-2 se comportan de manera más agresiva (Fujimura, Ohta, Oyama, Miyashita, & Miwa, 2006).

En definitiva, diversos estudios han demostrado que la inmunoexpresión de COX-2 aumenta en la secuencia tejido normal-adenoma-carcinoma, estando relacionada con un estadio tumoral avanzado preferentemente y con la sobreexpresión de Ki-67, así como con la diferenciación tumoral, metástasis linfáticas, linfovasculares y a distancia. En ciertos tumores se ha observado cómo el estadio tumoral y la alta expresión de COX-2 y de Ki-67 actúan como indicadores pronósticos independientes (Albasri *et al.*, 2018) (Figura 29).

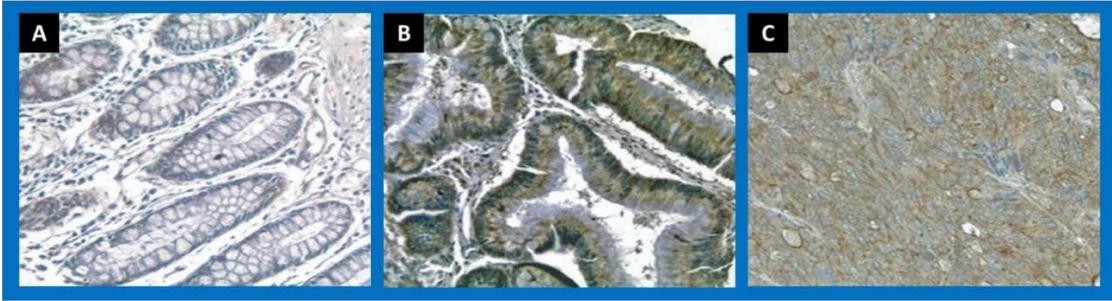


Figura 29. Inmunoeexpresión de COX-2 en colon. (A) Negativa en epitelio normal y positiva en (B) adenoma y (C) adenocarcinoma (modificado de Young et al., 2009).

SATB2

La proteína SATB2, codificada por el gen que lleva su mismo nombre, es una proteína de unión al DNA que regula la transcripción y el remodelamiento de la cromatina. Tiene un papel importante en el desarrollo de la diferenciación osteoblástica, neural y craneofacial. Se ha detectado su expresión inmunohistoquímica a nivel del cerebro, arco branquial, en lugares de formación de hueso, riñón, intestino delgado, colon, apéndice, testículo y epidídimo, así como en células linfoides (Conner & Hornick, 2015; C. J. Kim *et al.*, 2016).

Estudios recientes perfilan a SATB2 como un marcador altamente específico de metástasis colorrectales o apendiculares frente a carcinomas ováricos mucinosos (Moh *et al.*, 2016; Perez Montiel *et al.*, 2015). También se han observado niveles bajos de inmunoeexpresión de SATB2 en tumores malignos de pulmón y del tracto ginecológico (Dragomir, de Wit, Johansson, Uhlen, & Ponten, 2014; F. Lin *et al.*, 2014). Además, la expresión de SATB2 en los CCR (bien diferenciados) se asocia a un mejor pronóstico (Eberhard *et al.*, 2012) (Figura 30).

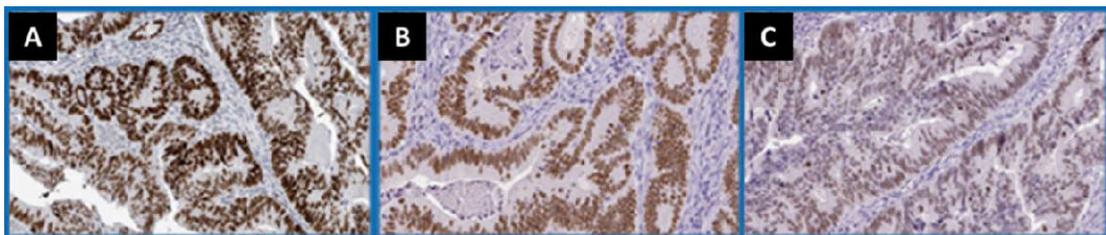


Figura 30. Inmunoeexpresión de STAB2 en adenocarcinomas de colon. (A y B) Tinción fuerte en >75% de las células. (C) Tinción moderada en más del 75% de las células (Modificado de The Human Protein Atlas website).

La proteína SATB2 se usa preferentemente como herramienta diagnóstica como marcador relativamente específico de diferenciación colorrectal. Hay datos que indican que SATB2 es un marcador menos sensible pero más específico para tumores de origen colorrectal o apendicular que CDX2. De esta manera, junto con el clásico panel de CK7, CK20 y CDX2, se utiliza para la identificación de CCR metastásicos. Se expresa en el 85% de los CCR, mientras que otros

carcinomas raramente lo expresan. En combinación con CK20, SATB2 identifica al 95% de todos los CCR (Magnusson *et al.*, 2011). Otra aplicación importante para los patólogos es su utilidad para distinguir CCR o apendiculares de los de origen pancreático o gástrico (F. Lin *et al.*, 2014). Por último, es de gran ayuda en la distinción de carcinomas ováricos mucinosos de tipo intestinal y metástasis de un CCR o de un adenocarcinoma apendicular. La expresión habitual de CK7+/CK20-/CDX2- para los carcinomas ováricos mucinosos y CK7-/CK20+/CDX2+ para los de origen colorrectal presenta un alto grado de solapamiento y muchas veces no resuelve los problemas diagnósticos (Bayrak, Haltas, & Yenidunya, 2012; M. J. Kim, 2005; Selves, Long-Mira, Mathieu, Rochaix, & Ilie, 2018; Shin *et al.*, 2010).

MUC5AC

Las mucinas son proteínas pesadas glicosiladas de alto peso molecular (Andrianifahanana, Moniaux, & Batra, 2006). Hasta el momento se han descrito más de 20 tipos de mucinas y se han clasificado en dos grupos de acuerdo a su estructura y función (Itoh *et al.*, 2008). Estas dos clases son: a) mucinas secretadas formadoras de gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6) y b) mucinas transmembrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12 y MUC17). MUC2 y MUC5AC están localizadas en la misma zona del cromosoma 11 (11p15.5) y su expresión y función está regulada por un mecanismo común (Kanoh *et al.*, 2008). El gen *MUC5AC*, que codifica la proteína que lleva su mismo nombre, se expresa en la mucosa gástrica y traqueobronquial, así como en el endometrio (metaplasia mucinosa, metaplasia/cambio eosinofílico (Moritani *et al.*, 2005), en el cambio sincitial superficial y el cambio ciliado pero no en el epitelio colónico normal (Bartman *et al.*, 1999).

Si bien esta proteína no se expresa en el colon normal, sí lo hace frecuentemente en adenomas o CCR de manera citoplasmática (Ishizu, Kumagai, Eishi, Takizawa, & Koike, 2004) (Figura 31). Se ha visto como aquellos pacientes con altos niveles de expresión de MUC5AC, de manera opuesta a lo que ocurre con la expresión de MUC2, tienden a mostrar carcinomas de colon peor diferenciados, tasas más altas de metástasis linfáticas y mayor estadio tumoral (H. Wang *et al.*, 2017). Por tanto, se puede concluir que la expresión de MUC5AC está asociada con el potencial maligno del carcinoma de colon. Otros estudios han observado una expresión elevada de MUC5AC en carcinomas de colon esporádicos con alta estabilidad de microsatélites (Losi *et al.*, 2004).

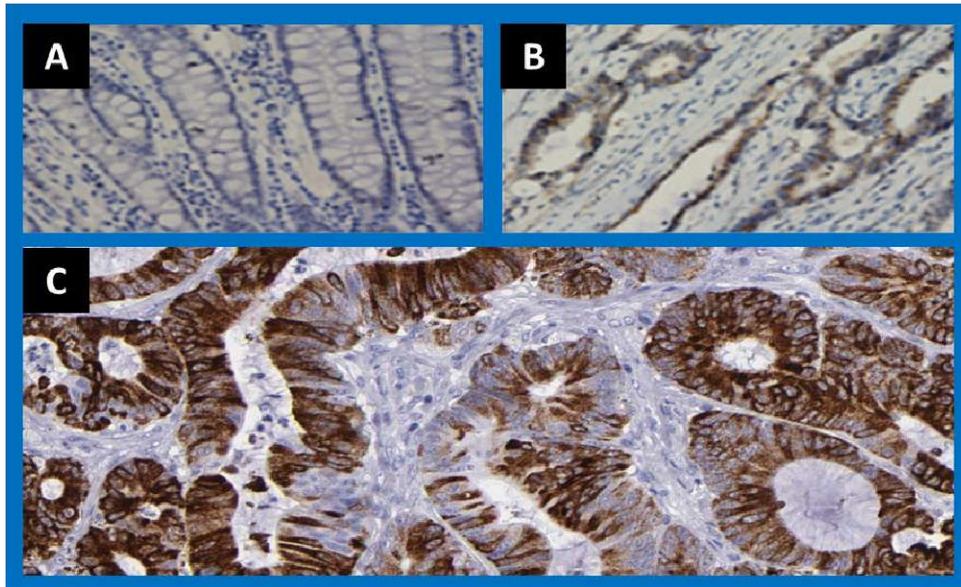


Figura 31. Inmunoeexpresión de MUC5AC en colon. (A) Expresión nula en el epitelio colónico normal (B) Inmunoeexpresión en adenocarcinoma de colon (C) Inmunoeexpresión fuerte en adenocarcinoma de colon en >75 % de las células (tinción citoplasmática/de membrana) (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

En el área de la Anatomía Patológica, MUC5AC tiene su utilidad por su expresión inmunohistoquímica en el cáncer de páncreas, algunos carcinomas gástricos y endometriales, así como en algunos CCR, de mama, ováricos, cervicales y hepáticos, en los que se ha observado de moderada a fuerte tinción citoplasmática (Kocer, McKolanis, & Soran, 2006; Lau, Weiss, & Chu, 2004; Matsukita *et al.*, 2003; Mitsuhashi *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2007; Yonezawa *et al.*, 1999)(Figura 32).

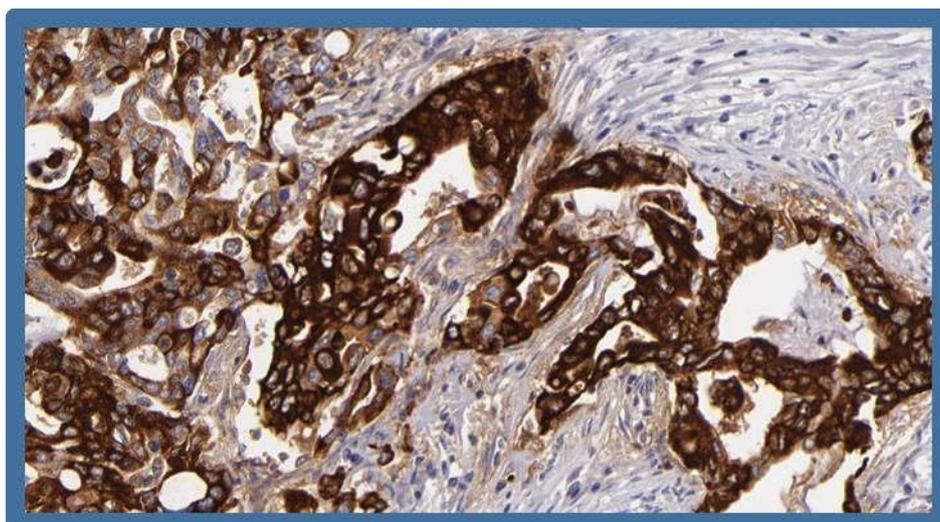


Figura 32. Inmunoeexpresión de MUC5AC en adenocarcinoma de páncreas. Inmunoeexpresión fuerte en >75% de las células (tinción citoplasmática/de membrana) (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

C-MET

El gen *MET*, es un protooncogen localizado en el cromosoma 7q31 que codifica un receptor con actividad tirosina quinasa para el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) (Bladt, Riethmacher, Isenmann, Aguzzi, & Birchmeier, 1995; Sattler & Salgia, 2007). C-MET es el único receptor de alta afinidad para el HGF y se expresa ampliamente en células de origen epitelial-endotelial, como células hepáticas, fibroblastos, células hematopoyéticas y queratinocitos (Lee *et al.*, 2018). La unión del HGF activado a C-MET da lugar a la dimerización o multimerización del receptor, a la fosforilación de múltiples residuos de tirosina en la región intracelular y consecuentemente a una señalización descendente para la movilidad, proliferación, supervivencia y morfogénesis (Zhang & Vande Woude, 2003). C-MET se activa de manera aberrante en muchos cánceres humanos por diversos mecanismos como mutaciones puntuales activadoras, amplificación del gen, sobreexpresión del mismo y mecanismos estimulantes autocrinos y paracrinos. En el CCR las mutaciones en *MET* son muy raras, y por lo tanto C-MET está principalmente activada por sobreexpresión del receptor (Mo & Liu, 2017).

La sobreexpresión inmunohistoquímica respecto a tejidos normales de C-MET, con tinción citoplasmática, se ha visto en varios cánceres humanos, como el gástrico, CCR, pancreático, pulmón, cabeza y cuello, ovario, riñón, próstata, melanoma y mama (Rosario & Birchmeier, 2003) (Figura 33). Como valor pronóstico, se ha demostrado su asociación a un pronóstico desfavorable en el cáncer de páncreas y en los de cabeza y cuello. En el CCR, los resultados no son concluyentes en cuanto a pronóstico aunque se ha intentado determinar en diversos estudios, algunos de los cuales sitúan su sobreexpresión como un factor de mal pronóstico (Abou-Bakr & Elbasmi, 2013; Lee *et al.*, 2018; Lux, Kahlert, Grutzmann, & Pilarsky, 2019).

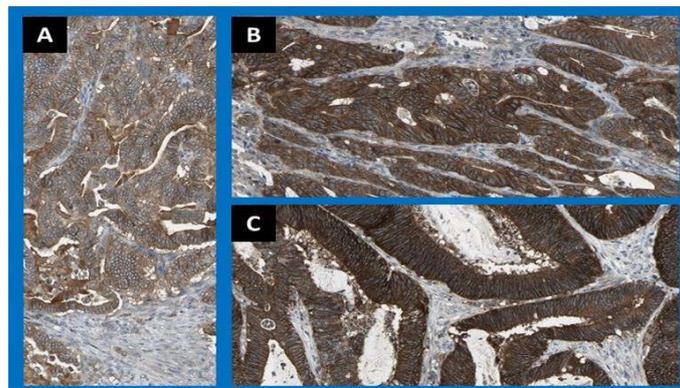


Figura 33. Inmunexpresión de C-MET en tumores malignos. (A) Adenocarcinoma de páncreas en >75% de las células con tinción citoplasmática/de membrana con intensidad moderada y (B y C) Adenocarcinoma de colon en >75% de las células con tinción citoplasmática/de membrana con intensidad fuerte (Modificado de The Human Protein Atlas website).

SOX9

El gen *SRY-box 9* codifica la proteína SOX9. Junto con SOX8 y SOX10, SOX9 es parte de la familia o grupo SOX, llamados SOXE (Pevny & Lovell-Badge, 1997). La función de estos factores de transcripción depende en gran parte del contexto y se unen y regulan de manera diferente dependiendo del ambiente en el que se encuentran. Por tanto, la regulación y funciones exactas de SOX9 son complejas. SOX9 es una molécula que se puede asociar a la vía de la β -catenina, siendo un gen diana clásico en las células cancerígenas colorrectales humanas, llevando a cabo un efecto de retroalimentación negativa inhibiendo la vía de señalización (Bastide *et al.*, 2007). Además, también se ha identificado que SOX9 puede estar ligado a la vía de señalización del erizo (“hedgehog pathways”) donde juega un papel fundamental en el desarrollo, diferenciación y senescencia de múltiples líneas celulares (Matheu *et al.*, 2012).

Se ha visto que SOX9 tiene efectos tanto oncogénicos como supresores tumorales en el CCR (Espersen, Olsen, Linnemann, Hogdall, & Troelsen, 2015; Matheu *et al.*, 2012). No obstante, su expresión parece asociarse a un peor pronóstico en los gliomas (X. Guo *et al.*, 2012; L. Wang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012), en el carcinoma hepatocelular (X. Guo *et al.*, 2012) y en los carcinomas de pulmón de célula no pequeña (Zhou *et al.*, 2012). En el cérvix, la hipermetilación de SOX9 se asocia frecuentemente a la carcinogénesis (J. H. Wu, Liang, Wu, Li, & Dai, 2013) y en los tumores de partes blandas de los pacientes con neurofibromatosis tipo 1 su expresión se asocia a un mayor potencial maligno (Carbonnelle-Puscian *et al.*, 2011). Marcker Espersen *et al.*, en un trabajo en 2015, publicaron en un estudio con 144 pacientes que la expresión baja de SOX9 en el frente de invasión de CCR en estadio II parece predecir un alto riesgo de recaída. Estos autores propusieron a este respecto que las células tumorales con esta expresión baja de SOX9 en el frente de invasión son un subclon que está adquiriendo propiedades para llevar a cabo la EMT, lo que les permite adquirir capacidades invasivas y por tanto aumentar su potencial metastásico. Por el contrario, estos mismos autores vieron como una expresión elevada de SOX9 en el frente de invasión en este grupo de pacientes se asociaba a un bajo riesgo de recaída. Así, concluyeron que SOX9 podría tener un papel importante como biomarcador para predecir el riesgo de recaída para tratamientos futuros personalizados (Marcker Espersen *et al.*, 2016) (Figura 34).

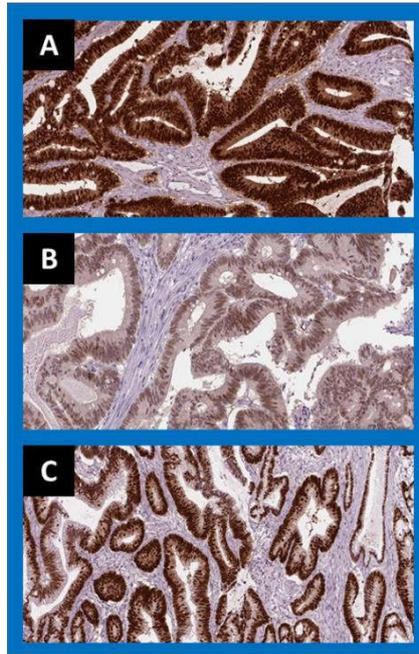


Figura 34. Inmunexpresión de SOX9 en adenocarcinomas de colon. (A) >75% de las células con tinción citoplasmática/de membrana y nuclear con intensidad fuerte. (B) 25-75 % de las células con tinción nuclear con intensidad moderada. (C) >75% de las células con tinción nuclear con intensidad fuerte (Modificado de The Human Protein Atlas *website*).

En el sector médico, especialmente en el ámbito de la patología, SOX9 tiene su utilidad fundamental en el diagnóstico diferencial entre el condrosarcoma mesenquimal (SOX9 positivo) y el osteosarcoma de célula pequeña (SOX9 negativo) (Fanburg-Smith, Auerbach, Marwaha, Wang, & Rushing, 2010).

2 RESULTADOS

A continuación, se representan en una tabla el análisis estadístico de los resultados obtenidos en forma de Score de 0 a 300 puntos, tras la valoración de la expresión inmunohistoquímica de las 8 moléculas estudiadas en los 52 pacientes, tanto en los CCR como en sus respectivas metástasis hepáticas (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas estudiadas. Se comparan las medias de los resultados en función de los tumores primarios y sus respectivas metástasis.

Marcadores	Score (0-300 puntos)		p-valor
	Tumores primarios	Metástasis hepáticas	
FAK	237,7 ± 79,9	233,4 ± 83,3	p= 0.804
STAT6	74,4 ± 47	73,4 ± 62,8	p= 0.835
COX 2	40,1 ± 49,8	67,5 ± 39,5	p= 0,019
SATB2	125 ± 88,1	175,3 ± 85,5	p= 0,009
MUC5	26,7 ± 52,1	5,9 ± 11,8	p= 0,045
C-MET	15,4 ± 28,1	35 ± 35,2	p= 0,070
SOX9	253,7 ± 76,1	284,7 ± 41,4	p= 0,039

*En negrita se representan los datos con significación estadística $p < 0,05$.

Entre los principales datos obtenidos destaca una sobreexpresión significativa de COX-2 en los tumores metastásicos respecto a los primarios (67,5 vs 40,1; $p = 0,019$), así como de SATB2 (175,3 vs 125,0; $p = 0,009$); C- MET (35 vs 15,4; $p = 0,070$) y de SOX9 (284,7 vs 253,7; $p = 0,039$). Se ha observado también una sobreexpresión de MUC5AC en los tumores primarios respecto a los metastásicos (26,7 vs 5,9; $p = 0,045$).

Hemos identificado la presencia de correlaciones de interés entre las moléculas del estudio tanto a nivel de su expresión en los tumores primarios como en las metástasis (Tablas 12 y 13). En relación con la inmunoexpresión de estas moléculas en los adenocarcinomas primarios de colon, se ha observado una correlación positiva moderada de SATB2 y de FAK ($r = 0,508$; $p = 0,002$); de C-MET y de MUC5AC ($r = 0,533$; $p = 0,001$); de SOX9 y de FAK ($r = 0,435$; $p = 0,006$), así como entre la expresión de SOX9 y de STAT-6 ($r = 0,387$; $p = 0,022$). Además, se ha observado una tendencia a la significación estadística entre la expresión de SOX9 y de C-MET en los tumores primarios ($r = 0,292$; $p = 0,064$). En cuanto al análisis en las muestras de tejido de las metástasis hepáticas, se ha identificado una correlación positiva moderada entre la expresión en los tumores metastásicos de COX-2 y FAK ($r = 0,345$; $p = 0,046$); de C- MET y SATB2 ($r = 0,418$; $p = 0,017$); de SOX9 y SATB2 ($r = 0,367$; $p = 0,022$), así como entre la expresión de SOX9 y C-MET ($r = 0,384$; $p = 0,025$). También se ha identificado una tendencia a la significación

estadística inversa entre la expresión de SATB2 y de COX-2 en los tumores metastásicos ($r = -0,280$; $p = 0.093$).

Tabla 12. Análisis de la correlación entre variables moleculares. Se compara los resultados de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas estudiadas, a nivel del tumor primario.

	FAK primarios	STAT6 primarios	COX 2 primarios	SATB2 primarios	MUC5AC primarios	C-MET primarios
STAT6 primarios	$r = 0,186$ $p = 0,292$					
COX 2 primarios	$r = 0,222$ $p = 0,208$	$r = -0,110$ $p = 0,543$				
SATB2 primarios	$r = 0,508$ $p = 0,002$	$r = -0,068$ $p = 0,703$	$r = 0,276$ $p = 0,114$			
MUC5 primarios	$r = -0,179$ $p = 0,310$	$r = 0,226$ $p = 0,213$	$r = -0,113$ $p = 0,554$	$r = -0,047$ $p = 0,788$		
C-MET primarios	$r = 0,019$ $p = 0,912$	$r = 0,190$ $p = 0,291$	$r = -0,159$ $p = 0,354$	$r = 0,020$ $p = 0,906$	$r = 0,533$ $p = 0,001$	
SOX9 primarios	$r = 0,435$ $p = 0,006$	$r = 0,387$ $p = 0,022$	$r = 0,057$ $p = 0,746$	$r = 0,205$ $p = 0,214$	$r = 0,009$ $p = 0,957$	$r = 0,292$ $p = 0,064$

*En negrita se representan los datos con significación estadística $p < 0,05$.

Tabla 13. Análisis de la correlación entre variables moleculares. Se compara los resultados de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas estudiadas, a nivel de las metástasis.

	FAK metástasis	STAT6 metástasis	COX-2 metástasis	SATB2 metástasis	MUC5AC metástasis	C-MET metástasis
STAT6 metástasis	$r = 0,183$ $p = 0,272$					
COX-2 metástasis	$r = 0,345$ $p = 0,046$	$r = 0,052$ $p = 0,760$				
SATB2 metástasis	$r = 0,049$ $p = 0,781$	$r = 0,248$ $p = 0,138$	$r = -0,280$ $p = 0,093$			
MUC5AC metástasis	$r = 0,037$ $p = 0,842$	$r = 0,158$ $p = 0,381$	$r = -0,079$ $p = 0,671$	$r = 0,069$ $p = 0,714$		
C-MET metástasis	$r = 0,011$ $p = 0,953$	$r = 0,068$ $p = 0,708$	$r = -0,144$ $p = 0,433$	$r = 0,418$ $p = 0,017$	$r = -0,109$ $p = 0,597$	
SOX9 metástasis	$r = -0,091$ $p = 0,599$	$r = 0,038$ $p = 0,819$	$r = -0,146$ $p = 0,374$	$r = 0,367$ $p = 0,022$	$r = 0,107$ $p = 0,553$	$r = 0,384$ $p = 0,025$

*En negrita se representan los datos con significación estadística $p < 0,05$.

A continuación, se representan las principales correlaciones de interés identificadas entre las variables clínico patológicas y las moléculas estudiadas (Tabla 14). Cabe destacar una correlación estadísticamente significativa de carácter leve-moderada entre la expresión de STAT6 en las metástasis y la SG ($r = 0,325$; $p = 0,036$); entre la expresión de COX-2 en los tumores primarios y el TLE ($r = 0,304$; $p = 0,057$); una correlación inversa entre la expresión de SATB2 en

los tumores primarios y el número de ganglios positivos ($r = -0,390$; $p = 0,013$); entre la expresión de MUC5AC en las metástasis y las mitosis en el tumor primario ($r = 0,412$; $p = 0,033$) y entre la expresión de SOX9 en las metástasis y el tamaño del tumor primario ($r = 0,302$; $p = 0,055$). Además, se ha observado una tendencia a la significación estadística leve entre la expresión de STAT6 en los tumores primarios y la edad ($r = 0,279$; $p = 0,090$); entre la expresión de SATB2 en los tumores primarios y la SG ($r = 0,298$; $p = 0,059$); entre la expresión de SATB2 en los primarios y el TLE ($r = 0,267$; $p = 0,092$). También existió una tendencia a la correlación inversa entre la expresión de COX-2 en los primarios y el número de mitosis en las metástasis ($r = -0,296$; $p = 0,084$); entre la expresión de COX-2 en las metástasis y el número de mitosis en los tumores primarios ($r = -0,309$; $p = 0,091$); entre la expresión de SATB2 en las metástasis y el número de mitosis en las metástasis ($r = -0,286$; $p = 0,091$); entre la expresión de MUC5AC en los tumores primarios y la SG ($r = -0,282$; $p = 0,086$) y entre la expresión de C-MET en las metástasis y el tamaño del tumor primario ($r = -0,216$; $p = 0,090$).

Tabla 14. Análisis de la correlación entre variables clínicas, patológicas y moleculares. Se compara los resultados de la expresión inmunohistoquímica de las moléculas estudiadas, tanto a nivel del tumor primario como de la metástasis, con las principales variables cuantitativas del modelo.

	Edad	SG	TLE	SPM	Tamaño tumor	Ganglios positivos	Mitosis primario	Mitosis metástasis
FAK primarios	r= 0,016 p= 0,924	r= -0,113 p= 0,485	r= 0,204 p= 0,208	r= -0,001 p= 0,995	r= -0,107 p= 0,515	r= -0,079 p= 0,635	r= -0,048 p= 0,781	r= -0,113 p= 0,523
FAK metástasis	r= -0,172 p= 0,275	r= -0,034 p= 0,833	r= -0,054 p= 0,736	r= 0,089 p= 0,574	r= -0,056 p= 0,728	r= -0,064 p= 0,696	r= -0,045 p= 0,793	r= -0,195 p= 0,247
STAT6 primarios	r= 0,279 p= 0,090	r= -0,047 p= 0,781	r= 0,081 p= 0,629	r= -0,070 p= 0,577	r= 0,091 p= 0,594	r= 0,140 p= 0,409	r= -0,245 p= 0,175	r= 0,183 p= 0,308
STAT6 metástasis	r= 0,111 p= 0,485	r= -0,325 p= 0,036	r= -0,254 p= 0,104	r= -0,295 p= 0,158	r= -0,047 p= 0,771	r= -0,061 p= 0,706	r= -0,080 p= 0,653	r= -0,185 p= 0,267
COX-2 primarios	r= -0,199 p= 0,219	r= -0,082 p= 0,516	r= 0,304 p= 0,057	r= -0,076 p= 0,437	r= 0,203 p= 0,215	r= -0,179 p= 0,277	r= -0,128 p= 0,469	r= -0,296 p= 0,084
COX-2 metástasis	r= -0,048 p= 0,769	r= -0,117 p= 0,472	r= -0,122 p= 0,453	r= -0,076 p= 0,639	r= -0,126 p= 0,445	r= 0,266 p= 0,106	r= -0,309 p= 0,091	r= 0,142 p= 0,408
SATB2 primarios	r= -0,057 p= 0,722	r= 0,298 p= 0,059	r= 0,267 p= 0,092	r= 0,226 p= 0,155	r= 0,168 p= 0,294	r= -0,390 p= 0,013	r= 0,129 p= 0,467	r= 0,050 p= 0,771
SATB2 metástasis	r= -0,145 p= 0,371	r= 0,040 p= 0,805	r= 0,078 p= 0,633	r= -0,003 p= 0,983	r= 0,017 p= 0,920	r= -0,256 p= 0,121	r= 0,254 p= 0,167	r= -0,286 p= 0,091
MUC5 primarios	r= 0,072 p= 0,669	r= -0,282 p= 0,086	r= -0,145 p= 0,384	r= -0,190 p= 0,253	r= -0,194 p= 0,243	r= 0,209 p= 0,221	r= 0,016 p= 0,931	r= 0,240 p= 0,186
MUC5 metástasis	r= -0,226 p= 0,184	r= 0,059 p= 0,733	r= -0,064 p= 0,710	r= 0,079 p= 0,645	r= 0,016 p= 0,926	r= -0,184 p= 0,299	r= 0,412 p= 0,033	r= 0,039 p= 0,832
C-MET primarios	r= -0,003 p= 0,983	r= -0,124 p= 0,418	r= -0,105 p= 0,491	r= -0,067 p= 0,660	r= -0,145 p= 0,346	r= -0,087 p= 0,578	r= -0,011 p= 0,952	r= -0,014 p= 0,935
C-MET metástasis	r= -0,500 p= 0,780	r= -0,008 p= 0,963	r= -0,003 p= 0,987	r= -0,016 p= 0,927	r= -0,216 p= 0,090	r= 0,050 p= 0,782	r= -0,005 p= 0,979	r= -0,125 p= 0,510
SOX9 primarios	r= 0,057 p= 0,715	r= -0,013 p= 0,932	r= 0,098 p= 0,525	r= -0,020 p= 0,896	r= 0,156 p= 0,312	r= 0,058 p= 0,715	r= -0,039 p= 0,822	r= -0,045 p= 0,787
SOX9 metástasis	r= -0,213 p= 0,175	r= 0,072 p= 0,651	r= 0,130 p= 0,413	r= 0,068 p= 0,668	r= 0,302 p= 0,055	r= 0,005 p= 0,975	r= -0,025 p= 0,892	r= -0,730 p= 0,665

*En negrita se representan los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$). SG: supervivencia global; TLE: tiempo libre de enfermedad; SPM: supervivencia postmetástasis;

EXPRESIÓN DE QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL

La FAK es una molécula cuya expresión incrementada en los tumores se ha asociado con una mayor invasividad y agresividad de los mismos. La mayoría de las células tumorales en casi todas las neoplasias en las que se ha descrito muestran una inmunoreactividad citoplasmática débil o moderada (de Vicente et al., 2013; Ocak, Chen, Callison, Gonzalez, & Massion, 2012). En nuestro estudio se observó una expresión de FAK con este patrón de tinción en todos los tumores primarios y en sus respectivas metástasis hepáticas. Además, se identificó una expresión de FAK ≥ 250 puntos en el 65% de los tumores primarios y en el 62% de las metástasis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de FAK entre los tumores primarios y las metástasis ($237,7 \pm 79,9$ vs $233,4 \pm 83,3$; $p = 0,804$) (Tabla 11).

A continuación, se describen los resultados de comparar una expresión de FAK ≥ 250 con las variables clínico-patológicas del estudio (Tabla 15). Se identificó una asociación entre la expresión de FAK ≥ 250 puntos en las metástasis y una localización del tumor primario en el colon derecho ($p= 0,026$). Además, se identificaron datos relativos a tendencias hacia la asociación estadísticamente significativa entre la expresión de FAK ≥ 250 puntos en el tumor primario y la presencia de yemas tumorales en el tumor primario ($p= 0,058$) y mayor porcentaje de necrosis en las muestras del tumor primario ($p= 0,051$) (Figura 35).

Tabla 15. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con FAK en tumores primarios y metástasis. Representación de los resultados tras comparar las variables con la expresión de FAK ≥ 250 .

Marcadores	p-valor	
	Tumores Primarios	Metástasis
Estado del paciente (vivo)	0,329	0,453
Sexo (hombre)	0,609	0,433
Grado tumoral primario (alto)	0,805	0,398
Grado tumoral metástasis (alto)	0,878	0,328
Necrosis tumor primario (>50% de necrosis)	0,051	0,816
Necrosis en la metástasis (>50% de necrosis)	0,478	0,774
Mitosis en el tumor primario (>20 por 10 CGA)	0,571	0,335
Mitosis en la metástasis (>20 por 10 CGA)	0,410	0,362
Yemas tumorales	0,058	0,080
Localización tumor primario (colon derecho)	0,082	0,026
Ganglios regionales (negativos)	0,214	0,478
Lateralidad metástasis hepáticas (lóbulo derecho)	0,431	0,413

*Chi cuadrado. En negrita se representan los datos con significación estadística $p < 0,05$.

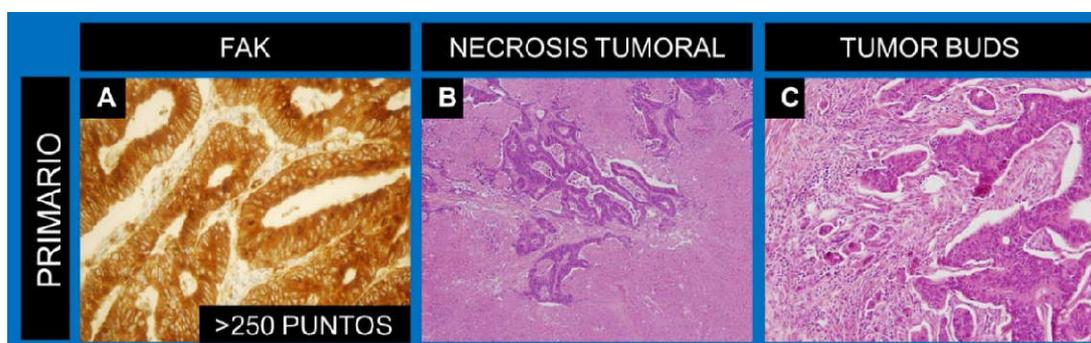


Figura 35. Imagen de inmunohistoquímica para FAK y aspectos histopatológicos de un adenocarcinoma primario de colon. Se representa que la expresión de FAK ≥ 250 puntos analizada en el tumor primario mostró una tendencia muy próxima a la significación estadística para la presencia de grandes áreas de necrosis y yemas tumorales.

Finalmente, se identificó una correlación significativa positiva y moderada entre los niveles de expresión de FAK en el adenocarcinoma primario de colon y sus niveles de expresión en las metástasis hepáticas ($r= 0,353$; $p=0,037$) (Figura 36).

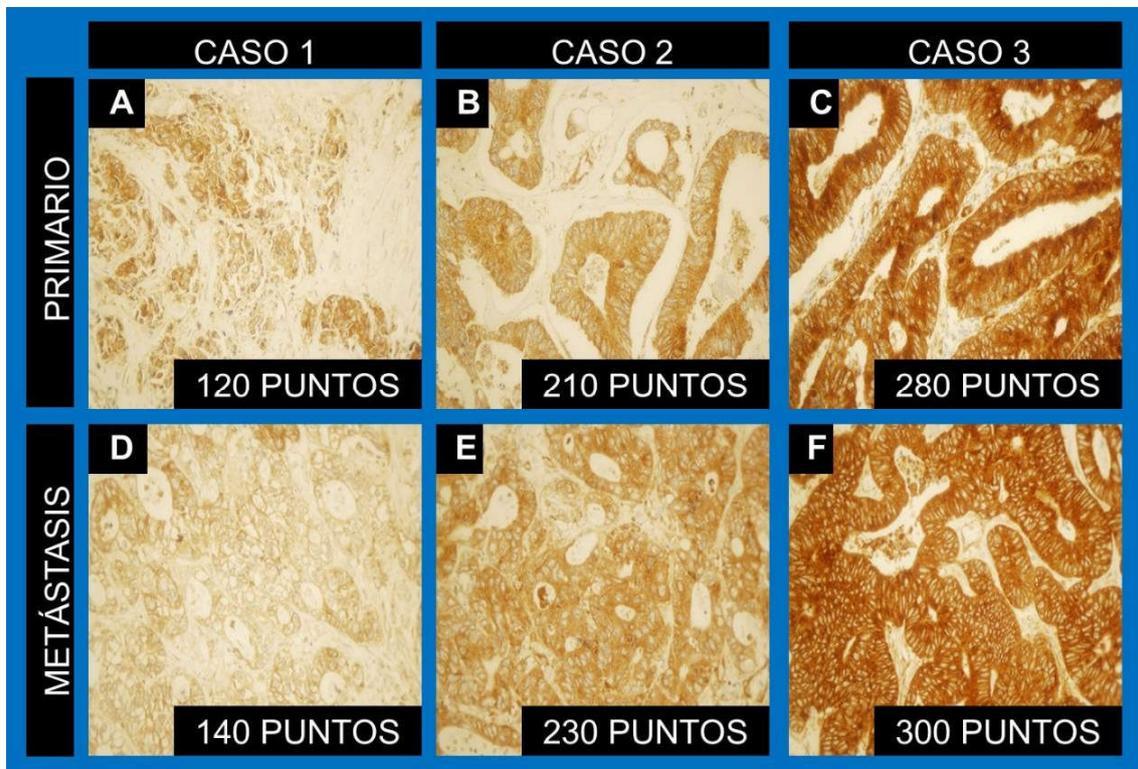


Figura 36. Imagen de inmunohistoquímica para FAK en los tumores primarios y en sus metástasis. Ejemplo de tres casos con expresión similar de FAK.

EXPRESIÓN DE STAT6

La proteína STAT6 es un miembro de la familia de factores transcripcionales STAT y su expresión inmunohistoquímica suele ser nuclear. No obstante, se ha observado también expresión de manera citoplasmática en algunos tumores a destacar el CCR (C. G. Wang *et al.*, 2010). En nuestro análisis, casi todos los adenocarcinomas primarios de colon y el 90 % de los tumores metastásicos muestran diferentes grados de inmunoexpresión de STAT6. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de STAT6 en los tumores primarios y en sus neoplasias metastásicas (74.41 vs 73.48; $p=0.835$) (Tabla 11 y Figura 37).

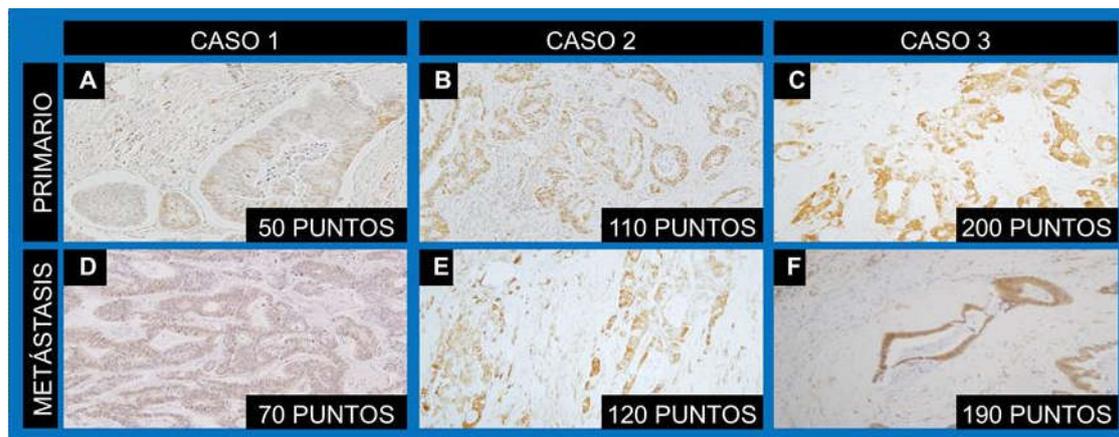


Figura 37. Imagen de inmunohistoquímica para STAT6 en los tumores primarios y en sus metástasis. Ejemplo de tres casos con expresión similar de STAT6.

Los tejidos metastásicos de adenocarcinoma de colon en el hígado con un valor mayor de 100 puntos de inmunoexpresión de STAT6 diferenciaron un grupo de pacientes con SG, SLE y SPM significativamente mejor ($p=0,001$; $p=0,006$; $p=0,004$ respectivamente) (Figura 38).

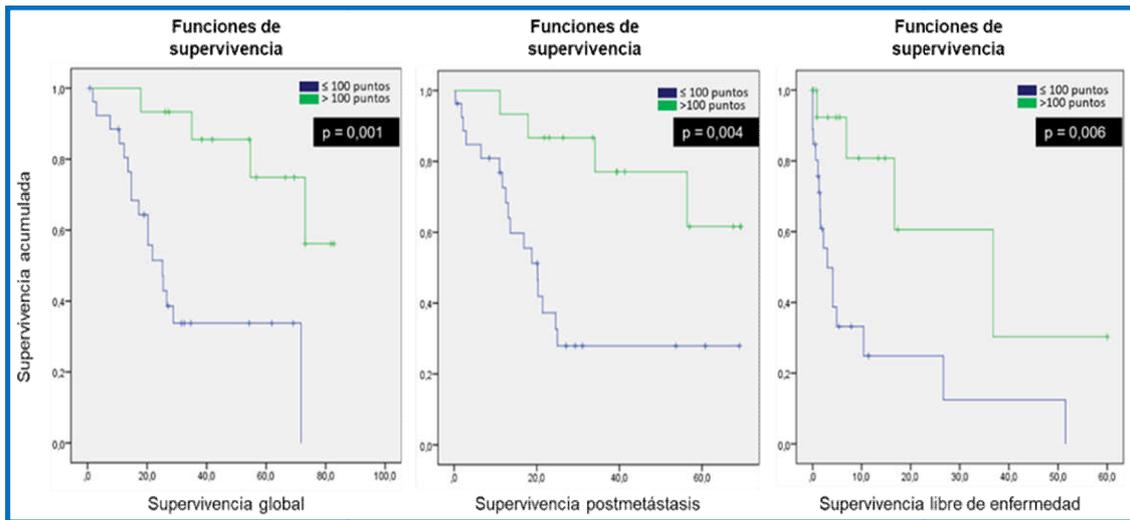


Figura 38. Análisis de supervivencia para STAT6. Curvas de supervivencia en meses que muestran como una expresión mayor de 100 puntos para STAT6 medido en las metástasis segrega un grupo de pacientes con mejor SG, TLE y SPM.

Finalmente, se identificó una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de STAT6 > 100 puntos en los tumores primarios y la presencia de necrosis en las metástasis ($p=0,035$), así como entre la expresión de STAT6 > 100 puntos en las metástasis con un estado vivo del paciente ($p=0,026$), el sexo masculino ($p=0,009$) y la presencia de amplia necrosis en el tumor primario ($p=0,034$) (Tabla 16).

Tabla 16. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con STAT6 en tumores primarios y metástasis. Representación de los resultados tras comparar las variables con la expresión de STAT 6 >100.

Marcadores	p-valor	
	Tumores Primarios	Metástasis
Estado del paciente (vivo)	0,117	0,026
Sexo (hombre)	0,231	0,009
Grado tumoral primario (alto)	0,695	0,685
Grado tumoral metástasis (alto)	0,270	0,228
Necrosis tumor primario (>50% de necrosis)	0,502	0,034
Necrosis en la metástasis (>50% de necrosis)	0,035	0,959
Mitosis en el tumor primario (>20 por 10 CGA)	0,398	0,153
Mitosis en la metástasis (>20 por 10 CGA)	0,485	0,528
Yemas tumorales	0,533	0,416
Localización tumor primario (colon derecho)	0,385	0,596
Ganglios regionales (negativos)	0,364	0,386
Lateralidad metástasis hepáticas (lóbulo derecho)	0,390	0,185

*Chi cuadrado. En negrita se representan los datos con significación estadística $p < 0,05$.

EXPRESIÓN DE COX-2

La proliferación celular es la base del desarrollo tumoral. Las ciclooxigenasas (COXs) son unas enzimas que se ha demostrado que regulan el desarrollo del tejido metaplásico y displásico así como la participación directa en el desarrollo y progresión del cáncer (B. Liu, Qu, & Yan, 2015; Roca-Ferrer et al., 2011). La COX-2 es conocida como la forma inducible de la enzima. Se ha observado su inmunexpresión principalmente citoplasmática en los diferentes tumores estudiados tales como el cáncer de mama, hígado, ovario, pulmón, tiroides, próstata, piel, esófago, estómago, colon, hígado o páncreas (Almeida et al., 2012; Garg et al., 2018; Z. Guo et al., 2015; Solanki, Agrawal, Ansari, Jain, & Jindal, 2018). En nuestro estudio observamos inmunexpresión positiva de COX-2 en el 80% de los adenocarcinomas primarios y en el 90% de sus metástasis, identificándose una sobreexpresión de COX-2 en los tumores metastásicos (67,5 vs 40,16; $p=0,019$) (Tabla 11 y Figura 39).

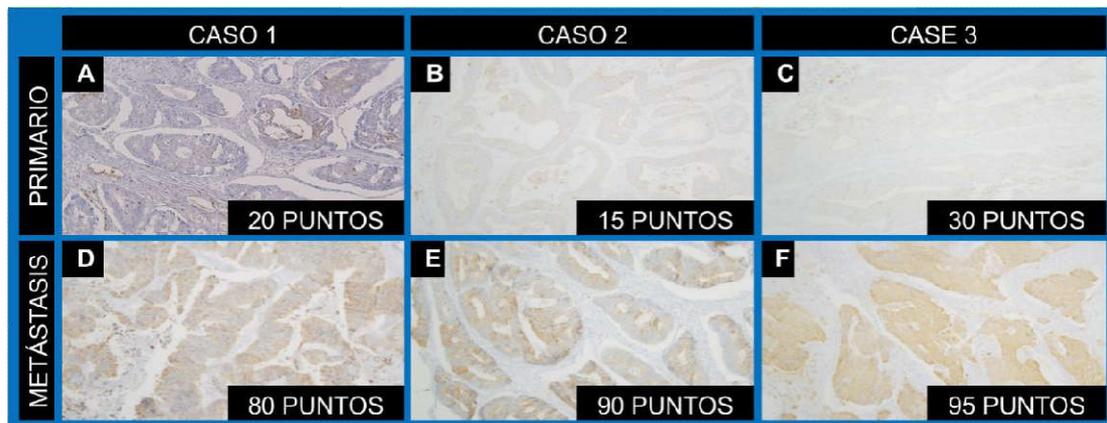


Figura 39. Imagen de inmunohistoquímica para COX-2 en los tumores primarios y en sus metástasis. Ejemplo de tres casos donde se aprecia mayor expresión en el tejido metastático.

Una expresión negativa de COX-2 en los CCR primarios mostró un grupo de pacientes con una SG significativamente más baja, menor TLE y menor SPM ($p=0,01$; $p=0,006$; $p=0,016$ respectivamente) (Figura 40).

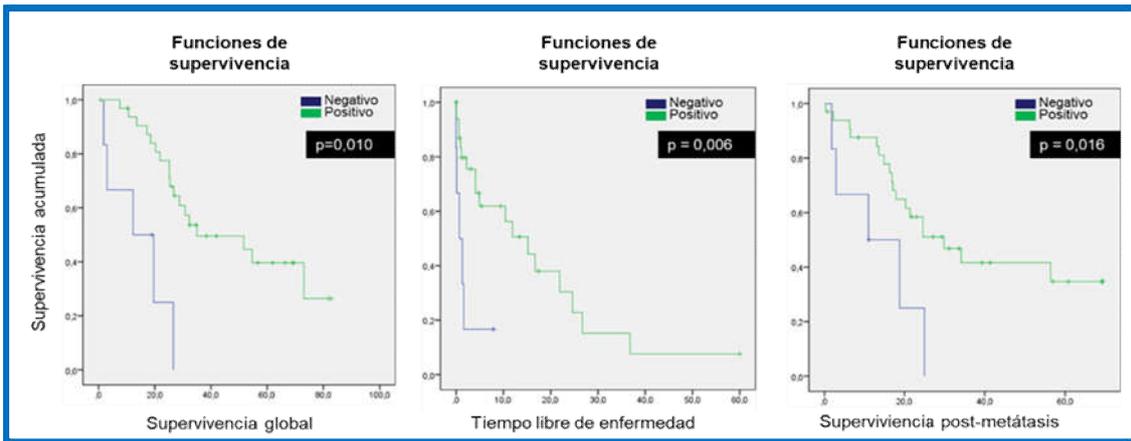


Figura 40. Análisis de supervivencia para COX-2. Curvas de supervivencia en meses que muestran como una expresión negativa de COX-2 en los CCR primarios segrega un grupo de pacientes con una SG significativamente más baja, menor TLE y menor SPM.

Finalmente, se identificó una tendencia cercana a la asociación estadísticamente significativa entre la expresión de COX-2 en los tumores metastásicos y la presencia de yemas tumorales en el tumor primario ($p=0,07$). Aunque la expresión negativa de COX-2 en los tumores primarios segregó a los pacientes en un grupo de peor pronóstico, no hemos identificado una asociación estadísticamente significativa con el estado vivo o muerto de los mismos (Tabla 17).

Tabla 17. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con COX-2 en tumores primarios y metástasis. Representación de los resultados tras comparar las variables con la expresión de COX-2 (positiva/negativa).

Marcadores	p-valor	
	Tumores Primarios	Metástasis
Estado del paciente (vivo)	0,196	0,345
Sexo (hombre)	0,388	0,505
Grado tumoral primario (alto)	0,849	0,628
Grado tumoral metástasis (alto)	0,506	0,200
Necrosis tumor primario (>50% de necrosis)	0,614	0,183
Necrosis en la metástasis (>50% de necrosis)	0,448	0,665
Mitosis en el tumor primario (>20 por 10 CGA)	0,535	0,302
Mitosis en la metástasis (>20 por 10 CGA)	0,719	0,603
Yemas tumorales	0,760	0,070
Localización tumor primario (colon derecho)	0,490	0,615
Ganglios regionales (negativos)	0,305	0,175
Lateralidad metástasis hepáticas (lóbulo derecho)	0,647	0,612

*Chi cuadrado. Valor de significación $p<0,05$.

EXPRESIÓN DE SATB2

Se ha detectado la expresión nuclear de la proteína SATB2 entre otros en cerebro, arco branquial, en lugares de formación de hueso, riñón, intestino delgado, colon, apéndice, testículo y epidídimo, así como en células linfáticas, pero tiene su utilidad fundamental para los patólogos como marcador de diferenciación colorrectal por lo que fue una de las proteínas que estudiamos en nuestro modelo.

Más del 90 % de los CCR primarios y de sus respectivas metástasis mostraron diferentes grados de inmunoexpresión de SATB2. Se observó una disminución significativa de SATB2 en los adenocarcinomas metastásicos (175,3 vs 125,0; $p=0,009$) (Figura 41). Además, se observó una correlación estadísticamente significativa e inversa entre el número de ganglios positivos y la expresión de SATB2 en los tumores primarios ($r= -0,390$; $p= 0,013$) (Tabla 14). Finalmente, los casos de adenocarcinomas de colon con más de 150 puntos de inmunoexpresión de SATB2 revelaron un grupo de pacientes con mejor SG, mejor TLR y mejor SPM (Figura 42).

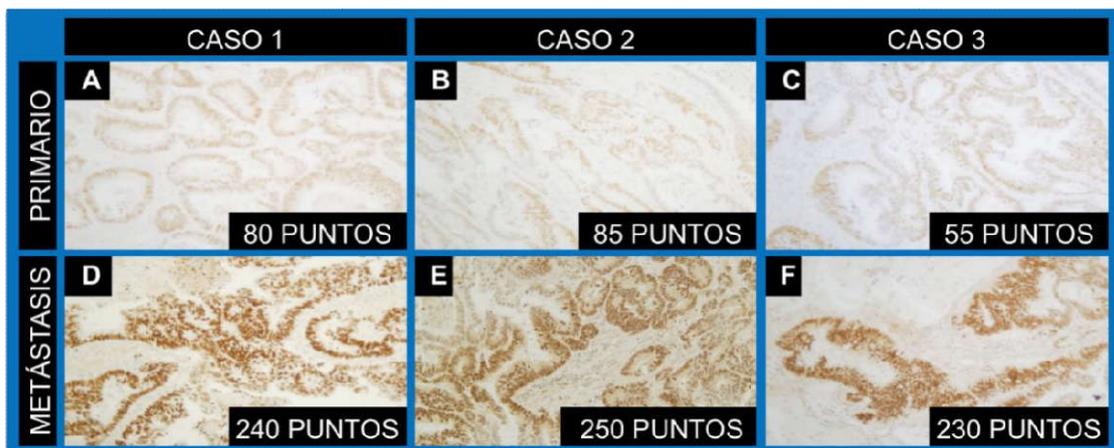


Figura 41. Imagen de inmunohistoquímica para SATB2 en los tumores primarios y en sus metástasis. Ejemplo de tres casos donde se aprecia mayor expresión en el tejido metastásico.

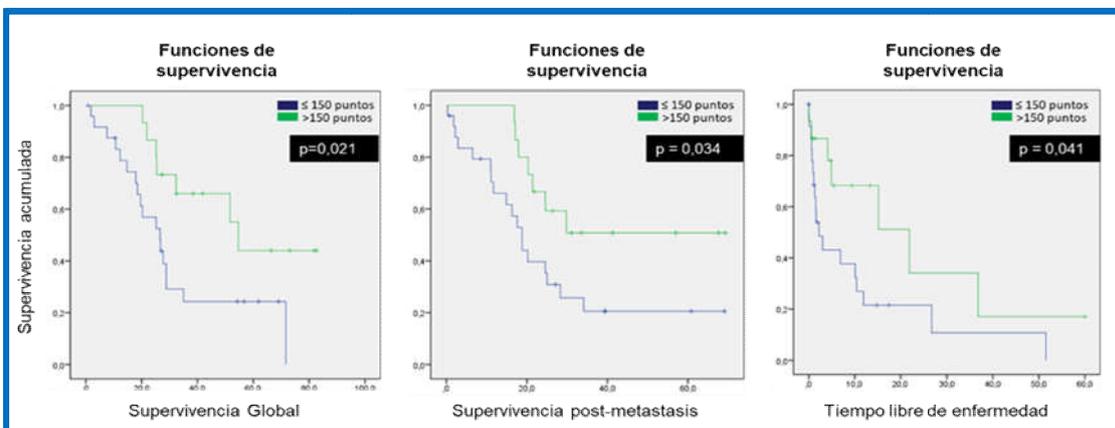


Figura 42. Análisis de supervivencia para SATB2. Curvas de supervivencia en meses que muestran como una expresión mayor de 150 puntos para SATB2 medido en el tumor primario segrega un grupo de pacientes con mejor SG, TLE y SPM.

Finalmente, se identificó una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de SATB2 ≥ 150 puntos en los tumores primarios y la presencia de ganglios linfáticos regionales ($p= 0,031$) (Tabla 18).

Tabla 18. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con SATB2 en tumores primarios y metástasis. Representación de los resultados tras comparar las variables con la expresión de SATB2 >150 .

Marcadores	p-valor	
	Tumores Primarios	Metástasis
Estado del paciente (vivo)	0,103	0,436
Sexo (hombre)	0,495	0,571
Grado tumoral primario (alto)	0,981	0,798
Grado tumoral metástasis (alto)	0,641	0,255
Necrosis tumor primario (>50% de necrosis)	0,740	0,622
Necrosis en la metástasis (>50% de necrosis)	0,835	0,407
Mitosis en el tumor primario (>20 por 10 CGA)	0,406	0,426
Mitosis en la metástasis (>20 por 10 CGA)	0,556	0,150
Yemas tumorales	0,475	0,366
Localización tumor primario (colon derecho)	0,251	0,283
Ganglios regionales (negativos)	0,031	0,393
Lateralidad metástasis hepáticas (lóbulo derecho)	0,834	0,707

*Chi cuadrado. En negrita se representan los datos con significación estadística $p<0,05$.

EXPRESIÓN DE MUC5AC

Esta es una proteína que normalmente está ausente en el colon normal y raramente en los CCR. Tiene su utilidad para los patólogos por su expresión inmunohistoquímica en el cáncer de páncreas, algunos carcinomas gástricos y endometriales, así como en algunos CCR, de mama, ováricos, cervicales y hepáticos, en los que se ha observado de moderada a fuerte tinción citoplasmática. Del estudio de esta molécula hemos observado que se expresó en el 35% de las muestras de adenocarcinoma y en el 25% de las metástasis, observándose una sobreexpresión estadísticamente significativa en los tumores primarios respecto a las metástasis (26.77 vs 5.77; $p=0,045$) (Figura 43).

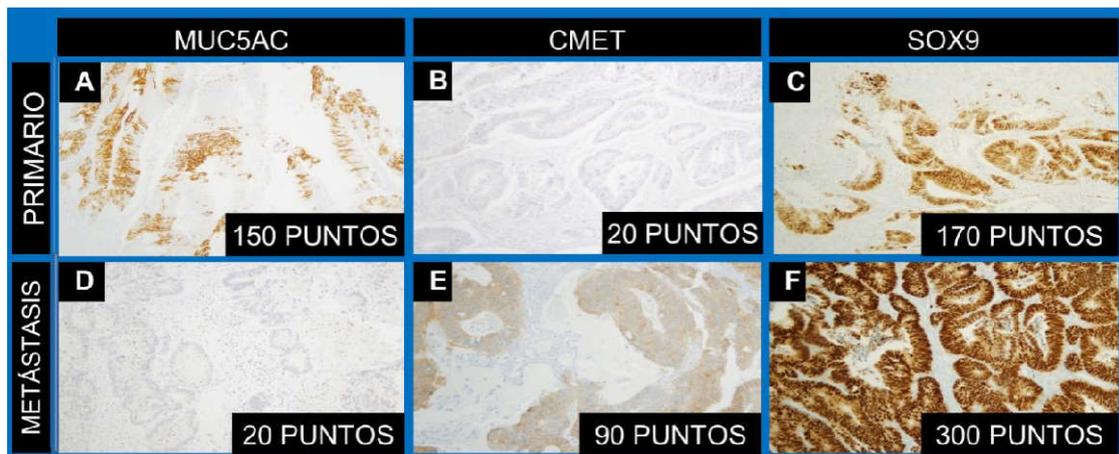


Figura 43. Imagen de inmunohistoquímica para MUC5AC, C-MET, SOX9 en los tumores primarios y en sus metástasis. Ejemplo de tres casos donde se aprecia una expresión variable en los tejidos.

Se identificó una tendencia cercana a la asociación estadísticamente significativa entre la expresión de MUC5AC en los tumores metastásicos y la presencia de necrosis en los tumores primarios ($p=0,057$), así como una tendencia a la significación entre la expresión de MUC5AC en las metástasis y la lateralidad de las metástasis hepáticas ($p=0,109$) (Tabla 19).

Tabla 19. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con MUC5AC en tumores primarios y metástasis. Representación de los resultados tras comparar las variables con la expresión de MUC5AC (positiva/negativa).

Marcadores	p valor	
	Tumores Primarios	Metástasis
Estado del paciente (vivo)	0,305	0,393
Sexo (hombre)	0,696	0,259
Grado tumoral primario (alto)	0,512	0,132
Grado tumoral metástasis (alto)	0,614	0,397
Necrosis tumor primario (>50% de necrosis)	0,217	0,057
Necrosis en la metástasis (>50% de necrosis)	0,850	0,903
Mitosis en el tumor primario (>20 por 10 CGA)	0,302	0,552
Mitosis en la metástasis (>20 por 10 CGA)	0,390	0,156
Yemas tumorales	0,340	0,432
Localización tumor primario (colon derecho)	0,535	0,152
Ganglios regionales (negativos)	0,500	0,398
Lateralidad metástasis hepáticas (lóbulo derecho)	0,530	0,109

*Chi cuadrado. Valor de significación $p<0,0$

EXPRESIÓN DE C-MET

El gen MET, es un protooncogen que codifica un receptor con actividad tirosina quinasa para el HGF y se activa de manera aberrante en muchos cánceres humanos con una tinción de

membrana/citoplasmática y, de estos, en el CCR la tinción es más fuerte cuando está presente. Se describe, aunque no hay resultados concluyentes, como un importante marcador pronóstico de invasión temprana y metástasis linfáticas regionales en el CCR.

En nuestro trabajo, C-MET se expresó en el 37% de los adenocarcinomas primarios mientras que en los tumores metastásicos la expresión alcanzó el 70% de los casos, observándose una sobreexpresión significativa en estos últimos respecto a los primarios (35,03 vs 15,44; $p=0,07$) (Figura 43). Además, se identificó una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de C-MET positiva en las metástasis y un alto grado tumoral ($p= 0,030$) (Tabla 20).

Tabla 20. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con C-MET en tumores primarios y metástasis. Representación de los resultados tras comparar las variables con la expresión de C-MET (positivo/ negativo).

Marcadores	p-valor	
	Tumores Primarios	Metástasis
Estado del paciente (vivo)	0,338	0,600
Sexo (hombre)	0,366	0,049
Grado tumoral primario (alto)	0,636	0,277
Grado tumoral metástasis (alto)	0,980	0,123
Necrosis tumor primario (>50% de necrosis)	0,373	0,740
Necrosis en la metástasis (>50% de necrosis)	0,320	0,567
Mitosis en el tumor primario (>20 por 10 CGA)	0,560	0,473
Mitosis en la metástasis (>20 por 10 CGA)	0,365	0,530
Yemas tumorales	0,618	0,688
Localización tumor primario (colon derecho)	0,198	0,213
Ganglios regionales (negativos)	0,294	0,549
Lateralidad metástasis hepáticas (lóbulo derecho)	0,713	0,514

*Chi cuadrado. En negrita se representan los datos con significación estadística $p<0,05$

EXPRESIÓN DE SOX9

SOX9 es un factor de transcripción y como tal se ha visto que tiene efectos tanto oncogénicos como supresores tumorales en el CCR y en otros tumores. Por tanto, nos pareció un buen marcador para analizar en nuestro estudio. Su expresión suele ser nuclear y también se expresa de manera citoplasmática/de membrana. Nuestros resultados concluyen que más del 95% de los casos de CCR primarios muestran inmunoexpresión para SOX9, así como la totalidad de los casos metastásicos. De manera adicional, se observó una significativa sobreexpresión de SOX9 en el tejido metastásico respecto a los primarios ($284,7 \pm 41,4$ vs $253,7 \pm 76,1$; $p=0,039$)(Tabla 11, Figura 43).

Finalmente, se identificó una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de máxima de 300 puntos de SOX9 en los tumores metastásicos y el grado tumoral del tumor primario ($p=0,030$), así como una tendencia cercana a la significación estadística entre la expresión máxima de 300 puntos de SOX9 en las metástasis y la presencia de yemas tumorales en el tumor primario ($p=0,078$) (Tabla 21).

Tabla 21. Asociaciones entre variables cualitativas del estudio con SOX9 en tumores primarios y metástasis. Representación de los resultados tras comparar las variables con la expresión de SOX9 de 300.

Marcadores	p-valor	
	Tumores Primarios	Metástasis
Estado del paciente (vivo)	0,445	0,303
Sexo (hombre)	0,605	0,384
Grado tumoral primario (alto)	0,982	0,030
Grado tumoral metástasis (alto)	0,513	0,870
Necrosis tumor primario (>50% de necrosis)	0,872	0,619
Necrosis en la metástasis (>50% de necrosis)	0,135	0,674
Mitosis en el tumor primario (>20 por 10 CGA)	0,348	0,211
Mitosis en la metástasis (>20 por 10 CGA)	0,279	0,721
Yemas tumorales	0,201	0,078
Localización tumor primario (colon derecho)	0,366	0,524
Ganglios regionales (negativos)	0,435	0,465
Lateralidad metástasis hepáticas (lóbulo derecho)	0,219	0,652

*Chi cuadrado. Valor de significación $p<0,05$.

3 DISCUSIÓN

FAK

La proteína FAK es una molécula con gran relevancia en el ámbito de los tumores, especialmente porque se ha descrito que está sobreexpresada en muchos tipos de tumores y que su expresión y/o actividad incrementada en las neoplasias se ha asociado con una mayor invasividad y agresividad de las mismas (Bauer *et al.*, 2019). En nuestro trabajo hemos identificado una tendencia muy cerca de la significación para valores altos de FAK, superiores a 250 puntos, para una correlación con un mayor porcentaje de necrosis en el tumor primario y la presencia de yemas tumorales. Christel Devaud *et al.*, han descrito recientemente que FAK es una molécula tirosin quinasa citoplasmática ubicua que promueve la progresión tumoral y los procesos metastásicos actuando en las células cancerígenas y en el microambiente tumoral y que su sobreexpresión en CCR primarios y en sus metástasis está asociada a un peor pronóstico para estos pacientes. Estos autores identificaron 3 de las 8 variantes de ARNm de FAK (FAK0, FAK28 y FAK6) expresadas de manera diferente a lo largo del proceso de carcinogénesis colorrectal. Sus resultados sugirieron que FAK0 and FAK6 podrían representar marcadores de mal pronóstico en el CCR y también un papel más específico de FAK28 en las interacciones entre las células tumorales y su microambiente. Finalmente concluyeron que FAK podría representar futuras dianas terapéuticas en el desarrollo del CCR y sus respectivas metástasis (Devaud *et al.*, 2019). FAK, el ácido hialurónico (AH) y el ácido hialurónico sintetasa 3 (AH3) se han descrito como implicados en el crecimiento tumoral y en las metástasis (Heffler *et al.*, 2013). Otros autores han estudiado la molécula y han concluido que FAK podría ser clave para la debilidad de la interacción célula a célula y célula-matriz extracelular, siendo éstos responsables del desarrollo de metástasis en el CCR (Beraud-Dufour *et al.*, 2016).

La expresión de FAK es mayor en los adenocarcinomas de mama y colon que otras moléculas tirosin quinasa que se sabe que están sobreexpresadas en el cáncer, como SRC (Iravani *et al.*, 1998). Sin embargo, si bien FAK está expresada en CCR y dicha expresión parece ser un indicador temprano del desarrollo de CCR, así como tener un papel como marcador del desarrollo de lesiones malignas en aquellas premalignas (Cance *et al.*, 2000), no se ha demostrado que su expresión pueda predecir el pronóstico de los pacientes, tal y como hemos descrito también en nuestro trabajo (Theocharis *et al.*, 2003).

STAT6

La utilidad diagnóstica fundamental de este marcador inmunohistoquímico radica para los patólogos en la inmunoexpresión altamente sensible y casi específica para el TFS (W. Guo *et al.*, 2011). Trabajos previos han descrito en el CCR cómo la expresión de STAT6 está relacionada con el estadio TNM clínico, las metástasis linfáticas y las hepáticas, sugiriendo también que STAT6 podría estar en relación con la progresión del cáncer y enfatizando el hecho de que STAT6 es un factor de transcripción latente de la familia STAT que está constitutivamente activado en múltiples cánceres (Das, Roth, Wasson, & Vishwanatha, 2007). Sin embargo, también se ha observado expresión citoplasmática en algunos CCR y parece que tiene su papel en la carcinogénesis de estos tumores (Slattery, Lundgreen, Kadlubar, Bondurant, & Wolff, 2013). Nuestros resultados están en consonancia con los datos descritos previamente en la literatura, observando una expresión en prácticamente todos los adenocarcinomas primarios de nuestro modelo y en el 90% de las metástasis. Sin embargo, existe evidencia en la literatura del estudio de la inmunoexpresión de STAT6 conjunta con EZH2 describiendo datos que apoyan un pronóstico significativamente peor para aquellos pacientes con expresión negativa de ambos marcadores, hecho que hemos observado en nuestro trabajo, cuando una inmunoexpresión inferior o igual a 100 puntos de STAT6 valorada en el tejido metastásico segregó un grupo de pacientes con un evidente peor pronóstico (C. G. Wang *et al.*, 2010). Parece preciso recordar que el grupo de pacientes incluidos en nuestro estudio reúnen unas características especiales, ya que son un grupo selecto de casos sesgados por la presencia comprobada de metástasis hepáticas independientemente de su tratamiento o del estadio del tumor primario. Este hecho marca la diferencia con los trabajos previamente publicados, que en su mayoría estudian los tumores primarios haciendo especial énfasis en su estadio y su manejo terapéutico.

La vía IL-4/STAT6 funcionalmente activa tiene importantes implicaciones patofisiológicas en varios tipos celulares y enfermedades (Bruns & Kaplan, 2006). En estudios realizados en la investigación contra el cáncer se ha visto como ratones que carecen de esta proteína tienen una inmunidad aumentada tanto en los tumores primarios como en los metastásicos (Ostrand-Rosenberg, Grusby, & Clements, 2000; Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2004), así como inducen el rechazo espontáneo de tumores implantados (Kacha, Fallarino, Markiewicz, & Gajewski, 2000). Estos hallazgos en animales se han identificado también en humanos donde se ha visto cómo esta proteína está activada en diferentes cánceres además del CCR, como el cáncer de próstata (Ni *et al.*, 2002), el linfoma de células T cutáneo (Qin *et al.*, 2001), el linfoma de Hodgkin (Skinnider *et al.*, 2002) o el linfoma B de célula grande primario mediastínico (Skinnider *et al.*, 2002). Estos datos apoyan la hipótesis de que la vía funcional de STAT6 favorece la carcinogénesis, el crecimiento tumoral y quizá las metástasis por diferentes tipos de

mecanismos, como resistencia a la apoptosis o escapando a la vigilancia del sistema inmune (B. H. Li et al., 2008).

COX-2

La proteína COX-2 es clave en la producción de las prostaglandinas y se ha asociado con un papel fundamental en la carcinogénesis, además de su conocido papel en la inflamación (Tsujii, Kawano, & DuBois, 1997). Normalmente está ausente o presente en niveles bajos en el epitelio colónico normal y sobreexpresada en el adenocarcinoma (Soumaoro *et al.*, 2004). Además, está involucrada en la carcinogénesis y en el proceso metastásico del CCR. Entre los efectos de COX-2 están participar en la proliferación celular, el crecimiento tumoral, la resistencia a la apoptosis y la capacidad de respuesta inmune (Dubois *et al.*, 1998). Estudios epidemiológicos han propuesto que el uso a largo plazo de AINE podría reducir el riesgo de desarrollo de CCR, ya que el efecto antineoplásico de la inhibición de COX-2 podría basarse en diferentes vías, incluidos cambios en la sensibilidad a la apoptosis o la acción antiangiogénica (Iwama, 2009). Estudios *in vitro* han demostrado que la sobreexpresión de COX-2 reduce la tasas de apoptosis, incrementa la invasividad de las células malignas y promueve la angiogénesis (Tachimori, Yamada, Amano, Ohira, & Hirakawa, 2008).

Trabajos previos han sugerido un papel importante de COX-2 en las metástasis vía hemática del colon al hígado, hecho sustancial del que versa nuestro trabajo (de Heer, Sandel, *et al.*, 2008; Kakiuchi *et al.*, 2002). En un estudio realizado por H. Kasper *et al.*, en el que estudiaron también CCR con metástasis hepáticas, los adenomas mostraron una expresión de COX-2 en el 40-90% de los casos, mientras que los adenocarcinomas fueron positivos en más del 80 % de los casos (Kasper *et al.*, 2010; Sinicrope & Gill, 2004). Estos autores sólo incluyeron en su modelo casos que ya tenían metástasis hepáticas confirmadas para comparar la expresión entre ambos, un planteamiento similar al del presente estudio. En el CCR no parece que la expresión de COX-2 muestre un valor predictivo para el desarrollo de metástasis hepáticas (Ochiai *et al.*, 2008) mientras que en el cáncer gástrico este fenómeno fue descrito por Yu *et al.* (J. R. Yu *et al.*, 2005). COX-2 se expresó en casi todas las metástasis hepáticas de CCR, un hallazgo muy similar al observado en este trabajo, con significación estadística, donde se expresó en un 90% de las metástasis y en un 80 % de los tumores primarios. Autores como Chen *et al.*, encontraron también altos niveles de expresión en las metástasis hepáticas (W. S. Chen *et al.*, 2001). No obstante, en otros trabajos como los de Nakamoto *et al.*, observaron resultados muy similares a los anteriores destacando una inmunoexpresión de COX-2 superior en el tumor primario con respecto a las metástasis (Nakamoto *et al.*, 2007).

En 2015, Qi-Bing Wu *et al* investigaron la relación entre la expresión inmunohistoquímica de COX-2 y HER2 en el CCR. Sus resultados fueron que la sobreexpresión de ambos marcadores está asociada de manera considerable con la invasión serosa, la invasión linfática, el estadio de Duke y carcinomas pobremente diferenciados, así como que ambos tienen efectos sinérgicos en el CCR, siendo ambos marcadores importantes de invasión y metástasis (Q. B. Wu & Sun, 2015). Además, varios trabajos previos observaron que las tasas de supervivencia son significativamente más bajas para aquellos grupos de pacientes que muestran sobreexpresión de COX-2, estando ésta en relación con la recurrencia y las metástasis y negativamente con el pronóstico (Al-Maghrabi *et al.*, 2012; Elzagheid *et al.*, 2013; Soumaoro *et al.*, 2004). Además, se ha observado que COX-2 puede tener un papel importante en la carcinogénesis inicial del CCR, incrementándose su expresión desde el tejido normal, el adenoma y el CCR, progresivamente (A. W. Wu, Gu, Ji, Li, & Xu, 2003). Por el contrario, nuestro trabajo identificó un grupo de pacientes con peor pronóstico cuando COX-2 fue negativa en los tumores primarios. De la misma manera, se ha descrito que la subexpresión de COX-2 se relaciona con una menor SG y menor SLE en los casos de adenocarcinomas rectales, no así en los del colon (Lobo Prabhu *et al.*, 2014). En nuestro trabajo hemos identificado que una expresión negativa de COX-2 seleccionó un grupo de pacientes con un evidente peor pronóstico. Es pertinente decir que el grupo específico de pacientes incluidos en nuestro estudio reúnen unas características especiales, ya que son un grupo selecto de casos demostrados que han desarrollado metástasis (exclusivamente hepáticas) y, por tanto, estamos ante esos adenocarcinomas primarios de colon que, pese a todos los tratamientos previos, tanto quirúrgicos como con adyuvancia terapéutica (las que fueren), se han diseminado ineludiblemente.

SATB2

La proteína SATB2 es un marcador diagnóstico de ayuda para el CCR que se ha consolidado en la práctica hospitalaria durante los últimos años (Magnusson *et al.*, 2011). Su expresión es específica de tejido y las únicas células epiteliales que expresan SATB2 son las glandulares del tracto digestivo bajo, cuya expresión está regulada por micro-ARN 31 (miR-31) y miR-182. Esta proteína, junto con su análogo SATB1, está involucrada en varios cánceres, siendo su papel en esta enfermedad específico del tipo de cáncer. No obstante, la mayor parte de los datos existentes en la literatura sobre SATB2 están principalmente relacionados con el CCR, más que sobre cualquier otro tipo de neoplasia (Brocato & Costa, 2015). En nuestro modelo, más del 90 % de los CCR y de sus respectivas metástasis hepáticas mostraron diferentes grados de inmunoexpresión para STAB2, identificando mayor expresión en las metástasis. Además, en nuestro trabajo observamos que una expresión superior a 150 discriminaba un grupo de pacientes

con mejor pronóstico. En la literatura revisada se describen mayoritariamente trabajos que muestran datos similares. Así, Shuang Wang *et al*, en un estudio realizado en 2009, identificaron un nuevo papel de SATB2 en la progresión del CCR. Establecieron que la expresión de SATB2 está íntimamente relacionada con la invasión tumoral, las metástasis linfáticas y a distancia y la clasificación de Dukes del CCR. Sus resultados también avalaron que el nivel de expresión de la proteína SATB2 estaba muy relacionada con la SG y con la SLE. En análisis multivariable, un nivel de expresión de SATB2 alto se asoció a un mejor pronóstico en el CCR, lo que indica que SATB2 es un potencial factor pronóstico favorable para el CCR (S. Wang *et al.*, 2009). Otros autores vieron cómo una expresión alta de SATB2 es un factor independiente de buen pronóstico en el cáncer de colon pero no en el de recto. Además, en pacientes tratados con intención curativa en estadio III-IV, la expresión de SATB2 fue un predictor de respuesta a la quimioterapia adyuvante, independientemente de la localización tumoral, y en pacientes con cáncer de recto se observó una interacción significativa entre la expresión alta de SATB2 y la respuesta a la terapia neoadyuvante. También observaron una expresión más alta de STAB2 en los cánceres de recto que en los colónicos, sin alcanzar una diferencia estadística significativa (Eberhard *et al.*, 2012). Brocato *et al*, concluyeron en sus investigaciones que SATB2 es un supresor tumoral en el CCR y puede atenuar fenotipos malignos de CCR mediados por miR-31 y miR-182. También muestran que SATB2 es un biomarcador sensible para el CCR y que su expresión está asociada a buen pronóstico. También describen que a medida que el CCR progresa, se desdiferencia y se vuelve metastásico la expresión de SATB2 se pierde y por lo tanto puede no ser un buen método de detección para estadios avanzados de CCR. Por el contrario, en nuestro trabajo y a fin de repetir que los pacientes estudiados son un grupo específico y especial de pacientes con cáncer de colon, que a pesar de los tratamientos curativos han desarrollado metástasis hepáticas, hemos observado una sobreexpresión significativa de SATB2 en el tejido metastásico. La pérdida de SATB2 se acompaña de un aumento de la expresión de miR-31 y miR-182, siendo ambos factores de mal pronóstico (Brocato & Costa, 2015). La disminución de la expresión de SATB2 descrita por otros autores en función de la progresión del CCR puede estar relacionada con su expresión tejido-específica, pues las únicas células epiteliales que expresan esta proteína son las células glandulares del epitelio del tracto digestivo bajo (C. Ma *et al.*, 2019).

Además del CCR, SATB1 y SATB2 están involucrados en otros múltiples cánceres, pero su papel e importancia pronóstica varía según el tipo histológico. El consenso general para la mayoría de los cánceres es que la expresión de SATB1/SATB2 regula positivamente puntos clave en la carcinogénesis como la invasión, migración, grado tumoral, recurrencia y metástasis, a la vez que suponen un peor pronóstico. Algunos cánceres muestran excepciones a esta afirmación. Para SATB2, como ya hemos explicado, en el CCR y el carcinoma escamoso de laringe los resultados son opuestos y su sobreexpresión se asocia a mejor pronóstico (Brocato & Costa, 2015)

MUC5AC

MUC5, también conocida como MUC5AC, es una mucina del grupo de las secretoras formadoras de gel junto a MUC2, MUC5B y MUC6. Las mucinas son proteínas formadoras de gel altamente glicosiladas. MUC5AC se suele expresar en los adenocarcinomas primarios gástricos y en la mucosa traqueobronquial pero no suele estar presente en el tejido colónico normal (Bartman *et al.*, 1999). Así, MUC5AC se identifica raramente o con poca intensidad en el colon normal o en los pólipos hiperplásicos, pero si se observa con mayor frecuencia en adenomas de mayor tamaño con histología vellosa moderada o con displasia (G. E. Kim *et al.*, 2002). Sin embargo, la expresión de MUC5AC aumenta en el CCR diferenciado y la ausencia de su expresión puede ser un factor pronóstico de mayor agresividad en dichos carcinomas, relacionada con una desdiferenciación del mismo (Y. Imai *et al.*, 2013). En nuestro trabajo cerca del 60% de los tumores no expresaron MUC5AC y hemos observado una evidente disminución significativa en la inmunexpresión de MUC5AC en el tejido metastásico. En un estudio realizado por H. Wang *et al.*, en el que estudiaron MUC5AC, MUC2 y survivin en el CCR y su asociación con características clinicopatológicas, concluyeron que la secuencia tejido normal-CCR está asociada con una sobreexpresión significativa de MUC5AC y la ausencia de expresión de MUC2 (H. Wang *et al.*, 2017). En este sentido, se ha descrito que los tumores con ausencia de expresión de MUC5AC tienen un potencial maligno mayor y muestran un pronóstico más agresivo, por lo que MUC5AC podría ser un factor pronóstico útil en pacientes con CCR (Kocer *et al.*, 2006). Así, la expresión de MUC5AC estaría ausente en tejidos tumorales de pacientes con parámetros clinicopatológicos de mal pronóstico observando que tanto laSG como el TLE de los pacientes MUC5AC negativos está disminuida en comparación con los MUC5AC positivos. De hecho, los tumores MUC5AC negativos mostraron recurrencia o metástasis 5,5 veces más que los MUC5AC positivos (Kocer *et al.*, 2002). En nuestro caso no hemos identificado datos pronósticos similares. Si bien es cierto que nuestros casos han sido seleccionados exclusivamente por tener un potencial maligno alto, ya que tras un tratamiento curativo sin especificar (no hemos querido entrar en detalles) e independientemente del estadio tumoral del tumor primario, la enfermedad ha progresado y se ha diseminado al hígado. Así, casi dos tercios de los tumores primarios en nuestro estudio no expresaron MUC5AC y en relación a los datos previamente descritos, podría estar en relación con ese alto potencial de progresión de los adenocarcinomas de colon.

La expresión de MUC5AC se ha asociado con la inestabilidad de microsatélites en el CCR. Se ha sugerido que la MSI podría influir directamente en la producción de moco en el CCR tanto esporádico como hereditario, alternando los genes que están implicados en la síntesis y degradación del mismo (Messerini *et al.*, 1997). Así, los CCR con alta MSI tienen normalmente una expresión de MUC2 y MUC5AC mayor que los CCR sin MSI (Biemer-Huttmann *et al.*, 2000).

Boland *et al* vieron que los CCR con MSI tiene unos rasgos distintivos, como una peor diferenciación, apariencia mucinosa o en anillo de sello, así como diferente respuesta a la quimioterapia que los CCR sin MSI (Boland & Goel, 2010). Finalmente, la ganancia de MUC5AC se ha relacionado con un mejor pronóstico en los pacientes con CCR, especialmente en los estadios intermedios II y III, aunque se exprese en los adenomas displásicos y no en el tejido colónico normal, siendo su expresión muy débil o nula en los carcinomas pobremente diferenciados (Betge *et al.*, 2016).

C-MET

El protooncogén C-MET codifica un receptor tirosina quinasa que promueve la invasión tumoral y las metástasis. Estudios relativamente recientes han demostrado que la presencia de C-MET amplificado tiene un valor predictivo para el uso de inhibidores TK de C-MET en el carcinoma gástrico y en el de pulmón (Lutterbach *et al.*, 2007; Smolen *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Zhao-Shi Zeng *et al*, no encontraron diferencias en C-MET entre la mucosa colónica normal y el tejido hepático y la media de copias del gen fue significativamente elevada en el CCR respecto al tejido colónico normal (Z. S. Zeng *et al.*, 2008). Además, al igual que en nuestro estudio, también identificaron un incremento significativo de C-MET en las metástasis hepáticas respecto a los tumores primarios. Concretamente, observaron una amplificación del gen en un 2% de los tumores localizados, en un 9% de los cánceres con metástasis a distancia y en un 18% de las metástasis hepáticas. Así, describieron que la amplificación de C-MET está unida a la progresión tumoral y es una diana factible para un subgrupo significativo de CCR (Z. S. Zeng *et al.*, 2008). En este sentido, existe evidencia científica que sugiere que la amplificación de este gen es un evento tardío en la progresión del CCR y que se asocia con un mayor riesgo de metástasis hematógenas (S. Lin *et al.*, 1998). Así, el producto del protooncogén C-MET es importante entre las moléculas relacionadas con la celularidad metastásica, pues se ha demostrado que estimula la movilidad de las células cancerígenas, la invasión y las metástasis (Birchmeier, Birchmeier, Gherardi, & Vande Woude, 2003; Trusolino & Comoglio, 2002). La sobreexpresión de ARNm de C-MET y a nivel proteico se ha descrito en una amplia variedad de cánceres humanos (P. C. Ma, Maulik, Christensen, & Salgia, 2003), incluyendo el CCR (Kammula *et al.*, 2007; Z. Zeng *et al.*, 2004). En éste último, Di Renzo *et al* observaron que la amplificación del gen C-MET era de un 10% en los CCR primarios de su serie y en el 89% de las metástasis hepáticas (Di Renzo *et al.*, 1995). Zhao-Shi Zeng *et al*, demostraron que la amplificación del gen C-MET es un evento relativamente raro en el CCR primario (3,6%), siendo la mayoría de los casos amplificados casos primarios con metástasis sincrónicas en el hígado (estadio IV). Además, demostraron que la amplificación de C-MET está estadísticamente asociada con metástasis a distancia (Z. S. Zeng *et*

al., 2008). En este sentido, también hay datos en la literatura que definen que una alta expresión de ARNm de C-MET está relacionada con la profundidad de la invasión del tumor en la pared tumoral y con las metástasis linfáticas (Takeuchi *et al.*, 2003; Z. Zeng *et al.*, 2004; Z. S. Zeng *et al.*, 2008). Otros estudios relacionan la inmutación alta de C-MET con CCR mayores y en estadios tumorales avanzados, sugiriendo que esta proteína está involucrada en la progresión tumoral y en la mayor incidencia de recurrencia local (Al-Maghrabi *et al.*, 2015). Por tanto, alteraciones genéticas de C-MET proporcionan una ventaja biológica de crecimiento y supervivencia en el hígado, donde hay mucha expresión tisular de HGF, el ligando de C-MET (Imaizumi *et al.*, 2003).

Finalmente, y aunque en nuestro trabajo la expresión de C-MET no ha segregado grupos con diferente pronóstico, quizás porque todos los pacientes incluidos presentan un adenocarcinoma de colon de alto potencial maligno, el equipo de Su Jin Lee *et al.*, observaron que la inmutación aumentada de C-MET puede ser un importante biomarcador en el CCR y un indicador de mal pronóstico asociado a menor supervivencia (Lee *et al.*, 2018).

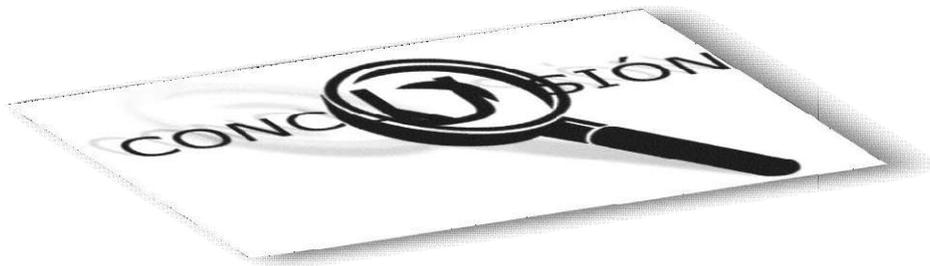
SOX9

SOX9 es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de “High Mobility Group” (HMG, Grupo de alta movilidad). Se expresa en una variedad de tejidos incluyendo el epitelio intestinal, donde se cree que actúa como un factor de homeostasis (Prevostel & Blache, 2017). La hipótesis de la célula madre cancerígena sugiere una organización jerárquica de los tumores, en la cual la célula madre (CSC) mantiene a los mismos y conduce o da lugar a las metástasis (Pattabiraman & Weinberg, 2014). Los mecanismos moleculares que sustentan la adquisición de las CSCs y los rasgos metastásicos no están aún bien dilucidados. SOX9 está ligado al mantenimiento de CSC y se expresa frecuentemente en los tumores sólidos, como el CCR. En un estudio realizado por Estefanía Carrasco-García *et al.*, obtuvieron que los niveles de SOX9 son más altos en los tumores metastásicos que en los CCR primarios, dato también observado en el presente trabajo. Así, SOX9 regula la migración e invasión y participa también en la transición entre los fenotipos epitelial y mesenquimal (Carrasco-García *et al.*, 2016).

Existe una evidenciación científica que destaca el impacto de SOX9 en los tumores malignos humanos (de la Rocha, Sampron, Alonso, & Matheu, 2014; Larsimont *et al.*, 2015; G. Wang *et al.*, 2013). De manera particular, muchos estudios han revelado que SOX9 está frecuentemente sobreexpresado en el CCR (Bruun *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2008; Matheu *et al.*, 2012), incluso en los casos en los que el gen está mutado (Cancer Genome Atlas, 2012). Desde el punto de vista clínico-patológico, se ha descrito que la alta sobreexpresión de SOX9 se correlacionó con la

progresión tumoral y un alto estadio tumoral (Matheu *et al.*, 2012) y se ha asociado con una SG menor (Shen *et al.*, 2015). Así, los cánceres con una expresión de SOX9 fuerte se asociaron a peor supervivencia a 5 años, concluyendo que esta sobreexpresión significativa es un factor pronóstico adverso independiente en el CCR y que por lo tanto la detección de esta proteína podría ayudar a predecir el comportamiento clínico en los pacientes con esta enfermedad (Lu *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que en el presente trabajo hemos incluido solamente adenocarcinomas de colon con alto potencial maligno ya que tienen evidencia probada de metástasis, no hemos observado diferencias significativas en términos de supervivencia, ni valores concretos de expresión de SOX9 han segregado a los pacientes en grupos con diferente pronóstico.

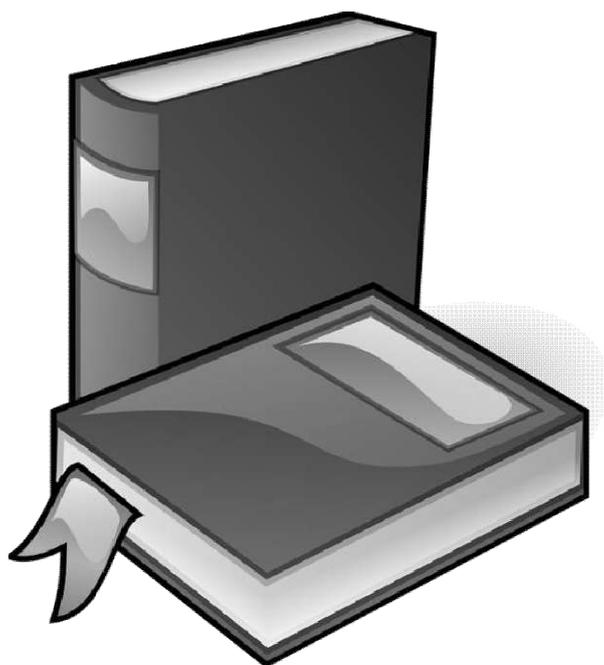
CONCLUSIONES



1 CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se han incluido 52 pacientes con adenocarcinoma de colon de alto potencial de malignidad que, pese a los tratamientos con intención curativa pertinentes, han desarrollado metástasis hepáticas. Así, la supervivencia global media para estos pacientes fue escasamente superior a los dos años y medio.
2. Los principales datos clínico-patológicos de este trabajo mostraron resultados similares a los descritos en la literatura, en términos de correlaciones entre variables (actividad mitótica, tamaño tumoral, adenopatías positivas, supervivencia) y en las curvas de supervivencia, atendiendo a parámetros como el grado de diferenciación, las yemas tumorales y la presencia de adenopatías locorregionales, dando mayor consistencia al proyecto elaborado.
3. Los adenocarcinomas primarios de colon incluidos en el trabajo no mostraron características clínicas atípicas en cuanto a sexo, edad de presentación, localización, estadio clínico u otras. Sin embargo, se han identificado aspectos histológicos y moleculares de mayor agresividad. Esto es, alto porcentaje de yemas tumorales, tendencia a la dediferenciación, a la necrosis y a la invasión ganglionar locorregional; así como la expresión de MUC5AC, STAT6, COX-2 y una alta expresión de FAK y SOX9.
4. Los adenocarcinomas primarios de colon mostraron diferencias relevantes desde el punto de vista histopatológico y molecular con sus respectivas metástasis hepáticas. El tejido metastásico destacó especialmente por tener un alto porcentaje de necrosis. Además, también mostró una menor diferenciación epitelial (subexpresión significativa de E-cadherina y β -catenina, las principales moléculas epiteliales de la EMT) y mostró algunos rasgos moleculares de mayor potencial de invasión, especialmente la sobreexpresión de COX-2 y SOX9 y un incremento de expresión de C-MET.
5. Se han identificado correlaciones estadísticamente significativas de interés entre las principales moléculas estudiadas tanto a nivel del tumor primario como del tejido metastásico, y con diferentes variables clínico-patológicas, tales como la edad, periodos de supervivencia, la actividad mitótica, el tamaño del tumor o el número de ganglios positivos.
6. Se identificaron puntos de corte con relevancia clínica para un gran número de las moléculas estudiadas. Cabe destacar los siguientes.
 - a. Una expresión negativa de COX-2 en los tumores primarios mostró un grupo de pacientes con mejor SG, TLE y SPM.
 - b. Una expresión de SATB2>150 puntos en los tumores primarios mostró un grupo de pacientes con mejor SG, TLE Y SPM.
 - c. Una expresión de β -catenina>150 puntos valorada en los tumores metastásicos seleccionó un grupo de pacientes con mejor SG, TLE y SPM.

BIBLIOGRAFÍA



1 BIBLIOGRAFÍA

- Amin MB, Edge S, Greene, F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK *et al.* AJCC Cancer Staging Manual. 8 ed. New York, Springer; 2017.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912
- Balaguer, F. (2014). [Hereditary and familial colorectal cancer]. *Gastroenterol Hepatol*, 37 Suppl 3, 77-84. doi: 10.1016/S0210-5705(14)70086-X
- Bernick, P. E., Klimstra, D. S., Shia, J., Minsky, B., Saltz, L., Shi, W., . . . Wong, W. D. (2004). Neuroendocrine carcinomas of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*, 47(2), 163-169. doi: 10.1007/s10350-003-0038-1
- Birkenkamp-Demtroder, K., Olesen, S. H., Sorensen, F. B., Laurberg, S., Laiho, P., Aaltonen, L. A., & Orntoft, T. F. (2005). Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut*, 54(3), 374-384. doi: 10.1136/gut.2003.036848
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi: 10.3322/caac.21492
- Bray, F., & Soerjomataram, I. (2015). The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control. In H. Gelband, P. Jha, R. Sankaranarayanan & S. Horton (Eds.), *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC).
- Carchman, E. (2019). Crohn's Disease and the Risk of Cancer. *Clin Colon Rectal Surg*, 32(4), 305-313. doi: 10.1055/s-0039-1683923
- Carethers, J. M., & Stoffel, E. M. (2015). Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J Gastroenterol*, 21(31), 9253-9261. doi: 10.3748/wjg.v21.i31.9253
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257. doi: 10.1038/35025220
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081. doi: 10.1093/carcin/bgp127
- Chandler, I., & Houlston, R. S. (2008). Interobserver agreement in grading of colorectal cancers—findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology*, 52(4), 494-499. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.02976.x
- Cho, Y. B., Chun, H. K., Yun, H. R., Kim, H. C., Yun, S. H., & Lee, W. Y. (2009). Histological grade predicts survival time associated with recurrence after resection for colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 56(94-95), 1335-1340.
- Christensen, J., & Rick, G. A. (1987). Intrinsic nerves in the mammalian colon: confirmation of a plexus at the circular muscle-submucosal interface. *J Auton Nerv Syst*, 21(2-3), 223-231. doi: 10.1016/0165-1838(87)90025-7
- Dillman, R. O., Aaron, K., Heinemann, F. S., & McClure, S. E. (2009). Identification of 12 or more lymph nodes in resected colon cancer specimens as an indicator of quality performance. *Cancer*, 115(9), 1840-1848. doi: 10.1002/cncr.24185
- Durko, L., & Malecka-Panas, E. (2014). Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 10, 45-54. doi: 10.1007/s11888-013-0203-4
- Enquist, I. B., Good, Z., Jubb, A. M., Fuh, G., Wang, X., Junttila, M. R., . . . Leong, K. G. (2014). Lymph node-independent liver metastasis in a model of metastatic colorectal cancer. *Nat Commun*, 5, 3530. doi: 10.1038/ncomms4530
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 29(6 Suppl 16), 15-18. doi: 10.1053/sonc.2002.37263

- Galceran, J., Ameijide, A., Carulla, M., Mateos, A., Quiros, J. R., Rojas, D., . . . Group, R. W. (2017). Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*, *19*(7), 799-825. doi: 10.1007/s12094-016-1607-9
- Garcia-Solano, J., Perez-Guillermo, M., Conesa-Zamora, P., Acosta-Ortega, J., Trujillo-Santos, J., Cerezuela-Fuentes, P., & Makinen, M. J. (2010). Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, *41*(10), 1359-1368. doi: 10.1016/j.humpath.2010.04.002
- Grider, J. R. (2003). Reciprocal activity of longitudinal and circular muscle during intestinal peristaltic reflex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *284*(5), G768-775. doi: 10.1152/ajpgi.00384.1998
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Haupt, B., Ro, J. Y., Schwartz, M. R., & Shen, S. S. (2007). Colorectal adenocarcinoma with micropapillary pattern and its association with lymph node metastasis. *Mod Pathol*, *20*(7), 729-733. doi: 10.1038/modpathol.3800790
- Islami, F., Goding Sauer, A., Miller, K. D., Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Jacobs, E. J., . . . Jemal, A. (2018). Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA Cancer J Clin*, *68*(1), 31-54. doi: 10.3322/caac.21440
- Iyengar, N. M., Gucalp, A., Dannenberg, A. J., & Hudis, C. A. (2016). Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *J Clin Oncol*, *34*(35), 4270-4276. doi: 10.1200/JCO.2016.67.4283
- Knox, R. D., Luey, N., Sioson, L., Kedziora, A., Clarkson, A., Watson, N., . . . Gill, A. J. (2015). Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Ann Surg Oncol*, *22*(9), 2988-2996. doi: 10.1245/s10434-014-4355-5
- Koelzer, V. H., Zlobec, I., & Lugli, A. (2016). Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*, *47*(1), 4-19. doi: 10.1016/j.humpath.2015.08.007
- Kunzelmann, K., & Mall, M. (2002). Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*, *82*(1), 245-289. doi: 10.1152/physrev.00026.2001
- Lopez-Abente, G., Ardanaz, E., Torrella-Ramos, A., Mateos, A., Delgado-Sanz, C., Chirlaque, M. D., & Colorectal Cancer Working, G. (2010). Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain. *Ann Oncol*, *21 Suppl 3*, iii76-82. doi: 10.1093/annonc/mdq091
- Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., . . . Quirke, P. (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*, *30*(9), 1299-1311. doi: 10.1038/modpathol.2017.46
- Luo, J., Solimini, N. L., & Elledge, S. J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, *136*(5), 823-837. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.024
- Mai, V., & Morris, J. G., Jr. (2004). Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J Nutr*, *134*(2), 459-464. doi: 10.1093/jn/134.2.459
- Mannucci, A., Zupparado, R. A., Rosati, R., Leo, M. D., Perea, J., & Cavestro, G. M. (2019). Colorectal cancer screening from 45 years of age: Thesis, antithesis and synthesis. *World J Gastroenterol*, *25*(21), 2565-2580. doi: 10.3748/wjg.v25.i21.2565
- Moran, B. J., & Jackson, A. A. (1992). Function of the human colon. *Br J Surg*, *79*(11), 1132-1137. doi: 10.1002/bjs.1800791106
- Muscat, J. E., & Wynder, E. L. (1994). The consumption of well-done red meat and the risk of colorectal cancer. *Am J Public Health*, *84*(5), 856-858. doi: 10.2105/ajph.84.5.856
- Naftalin, R. J. (1994). The dehydrating function of the descending colon in relationship to crypt function. *Physiol Res*, *43*(2), 65-73.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(3), 220-228. doi: 10.1038/nrm2858

- Neutra, M. R., Frey, A., & Kraehenbuhl, J. P. (1996). Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, *86*(3), 345-348. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80106-3
- Oberndorfer, F., & Mullauer, L. (2018). Molecular pathology of lung cancer: current status and perspectives. *Curr Opin Oncol*, *30*(2), 69-76. doi: 10.1097/CCO.0000000000000429
- Oh, B. Y., Park, Y. A., Huh, J. W., Yun, S. H., Kim, H. C., Chun, H. K., . . . Cho, Y. B. (2018). Prognostic Impact of Tumor-Budding Grade in Stages 1-3 Colon Cancer: A Retrospective Cohort Study. *Ann Surg Oncol*, *25*(1), 204-211. doi: 10.1245/s10434-017-6135-5
- Omran, A. R. (1971). The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q*, *49*(4), 509-538.
- Padera, T. P., Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C. M., Brown, E. B., Boucher, Y., . . . Jain, R. K. (2002). Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, *296*(5574), 1883-1886. doi: 10.1126/science.1071420
- Pietras, K., & Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*, *316*(8), 1324-1331. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.045
- Pyo, J. S., Sohn, J. H., & Kang, G. (2016). Medullary carcinoma in the colorectum: a systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol*, *53*, 91-96. doi: 10.1016/j.humpath.2016.02.018
- Ramiro-Puig, E., Perez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A., & Castell, M. (2008). [The bowel: a key component of the immune system]. *Rev Esp Enferm Dig*, *100*(1), 29-34. doi: 10.4321/s1130-01082008000100006
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. (2010). Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J Cell Biol*, *188*(6), 759-768. doi: 10.1083/jcb.200910104
- Schreuders, E. H., Ruco, A., Rabeneck, L., Schoen, R. E., Sung, J. J., Young, G. P., & Kuipers, E. J. (2015). Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut*, *64*(10), 1637-1649. doi: 10.1136/gutjnl-2014-309086
- Vanella, G., Archibugi, L., Stigliano, S., & Capurso, G. (2019). Alcohol and gastrointestinal cancers. *Curr Opin Gastroenterol*, *35*(2), 107-113. doi: 10.1097/MOG.0000000000000502
- Vasquez, M., Lira, B., Rodriguez, J., Falcon, N., Ocampo, J., Nishida, F., . . . Zanuzzi, C. (2016). Characterization of paneth cells in alpacas (*Vicugna pacos*, Mammalia, Camelidae). *Tissue Cell*, *48*(4), 383-388. doi: 10.1016/j.tice.2016.04.003
- Washington, M. K. (2008). Colorectal carcinoma: selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors. *Arch Pathol Lab Med*, *132*(10), 1600-1607. doi: 10.1043/1543-2165(2008)132[1600:CCSIP]2.0.CO;2
- White, A., Joseph, D., Rim, S. H., Johnson, C. J., Coleman, M. P., & Allemani, C. (2017). Colon cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer*, *123* Suppl 24, 5014-5036. doi: 10.1002/cncr.31076
- Wick, M. R., Vitsky, J. L., Ritter, J. H., Swanson, P. E., & Mills, S. E. (2005). Sporadic medullary carcinoma of the colon: a clinicopathologic comparison with nonhereditary poorly differentiated enteric-type adenocarcinoma and neuroendocrine colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol*, *123*(1), 56-65.
- Xu, L., Li, S., & Stohr, B. A. (2013). The role of telomere biology in cancer. *Annu Rev Pathol*, *8*, 49-78. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164030
- Zhao, Z., Feng, Q., Yin, Z., Shuang, J., Bai, B., Yu, P., . . . Zhao, Q. (2017). Red and processed meat consumption and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, *8*(47), 83306-83314. doi: 10.18632/oncotarget.20667
- Banyard, J., & Bielenberg, D. R. (2015). The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res*, *56*(5), 403-413. doi: 10.3109/03008207.2015.1060970
- Banyard, J., Chung, I., Migliozzi, M., Phan, D. T., Wilson, A. M., Zetter, B. R., & Bielenberg, D. R. (2014). Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of metastatic prostate cancer. *BMC Cancer*, *14*, 387. doi: 10.1186/1471-2407-14-387
- Banyard, J., Chung, I., Wilson, A. M., Vetter, G., Le Behec, A., Bielenberg, D. R., & Zetter, B. R. (2013). Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model. *Sci Rep*, *3*, 3151. doi: 10.1038/srep03151

- Bauer, M. S., Baumann, F., Daday, C., Redondo, P., Durner, E., Jobst, M. A., . . . Lietha, D. (2019). Structural and mechanistic insights into mechanoactivation of focal adhesion kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(14), 6766-6774. doi: 10.1073/pnas.1820567116
- Cao, Z., Livas, T., & Kyprianou, N. (2016). Anoikis and EMT: Lethal "Liaisons" during Cancer Progression. *Crit Rev Oncog*, *21*(3-4), 155-168. doi: 10.1615/CritRevOncog.2016016955
- Costa, M. L., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F., & Mermelstein, C. S. (2004). Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res*, *37*(12), 1819-1830. doi: 10.1590/s0100-879x2004001200007
- Cowin, P., Rowlands, T. M., & Hatsell, S. J. (2005). Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol*, *17*(5), 499-508. doi: 10.1016/j.ceb.2005.08.014
- Crofford, L. J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl*, *49*, 15-19.
- Cheng, F., & Eriksson, J. E. (2017). Intermediate Filaments and the Regulation of Cell Motility during Regeneration and Wound Healing. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *9*(9). doi: 10.1101/cshperspect.a022046
- Chui, M. H. (2013). Insights into cancer metastasis from a clinicopathologic perspective: Epithelial-Mesenchymal Transition is not a necessary step. *Int J Cancer*, *132*(7), 1487-1495. doi: 10.1002/ijc.27745
- De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, *13*(2), 97-110. doi: 10.1038/nrc3447
- Dews, I. C., & Mackenzie, K. R. (2007). Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(52), 20782-20787. doi: 10.1073/pnas.0708909105
- Fears, C. Y., & Woods, A. (2006). The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol*, *25*(7), 443-456. doi: 10.1016/j.matbio.2006.07.003
- Ferrari, S., Battini, R., Kaczmarek, L., Rittling, S., Calabretta, B., de Riel, J. K., . . . Baserga, R. (1986). Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol Cell Biol*, *6*(11), 3614-3620. doi: 10.1128/mcb.6.11.3614
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, *3*(5), 362-374. doi: 10.1038/nrc1075
- Fu, Y., Zheng, S., An, N., Athanasopoulos, T., Popplewell, L., Liang, A., . . . Zhu, Y. (2011). beta-catenin as a potential key target for tumor suppression. *Int J Cancer*, *129*(7), 1541-1551. doi: 10.1002/ijc.26102
- Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C. S., & Sahai, E. (2009). Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol*, *11*(11), 1287-1296. doi: 10.1038/ncb1973
- Greening, D. W., Gopal, S. K., Mathias, R. A., Liu, L., Sheng, J., Zhu, H. J., & Simpson, R. J. (2015). Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*, *40*, 60-71. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.008
- Guan, L., Li, T., Ai, N., Wang, W., He, B., Bai, Y., . . . Zhang, H. (2019). MEIS2C and MEIS2D promote tumor progression via Wnt/beta-catenin and hippo/YAP signaling in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, *38*(1), 417. doi: 10.1186/s13046-019-1417-3
- Halbleib, J. M., & Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*, *20*(23), 3199-3214. doi: 10.1101/gad.1486806
- Hasebe, T., Tamura, N., Iwasaki, M., Okada, N., Akashi-Tanaka, S., Hojo, T., . . . Kinoshita, T. (2010). Grading system for lymph vessel tumor emboli: significant outcome predictor for patients with invasive ductal carcinoma of the breast who received neoadjuvant therapy. *Mod Pathol*, *23*(4), 581-592. doi: 10.1038/modpathol.2010.3
- Hla, T., & Neilson, K. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(16), 7384-7388. doi: 10.1073/pnas.89.16.7384
- Hol, E. M., & Capetanaki, Y. (2017). Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *9*(12). doi: 10.1101/cshperspect.a021642

- Huber, A. H., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*, *90*(5), 871-882. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80352-9
- Jiang, J., Tang, Y. L., & Liang, X. H. (2011). EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther*, *11*(8), 714-723. doi: 10.4161/cbt.11.8.15274
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, *119*(6), 1420-1428. doi: 10.1172/JCI39104
- Katanaev, V. L. (2010). The Wnt/Frizzled GPCR signaling pathway. *Biochemistry (Mosc)*, *75*(12), 1428-1434. doi: 10.1134/s0006297910120023
- Khan, M. A., Chen, H. C., Zhang, D., & Fu, J. (2013). Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol*, *34*(5), 2497-2506. doi: 10.1007/s13277-013-1002-x
- Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S. A., & Zimmermann, P. (2009). The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(5), 662-669. doi: 10.1016/j.ceb.2009.05.002
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(3), 178-196. doi: 10.1038/nrm3758
- Lee, J. A., Bae, J. W., Woo, S. U., Kim, H., & Kim, C. H. (2011). D2-40, Podoplanin, and CD31 as a Prognostic Predictor in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. *J Breast Cancer*, *14*(2), 104-111. doi: 10.4048/jbc.2011.14.2.104
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*, *172*(7), 973-981. doi: 10.1083/jcb.200601018
- Lian, N., Wang, W., Li, L., Eleftheriou, F., & Yang, X. (2009). Vimentin inhibits ATF4-mediated osteocalcin transcription and osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, *284*(44), 30518-30525. doi: 10.1074/jbc.M109.052373
- Lien, W. H., Klezovitch, O., & Vasioukhin, V. (2006). Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr Opin Cell Biol*, *18*(5), 499-506. doi: 10.1016/j.ceb.2006.07.001
- Lopez-Novoa, J. M., & Nieto, M. A. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med*, *1*(6-7), 303-314. doi: 10.1002/emmm.200900043
- Manon-Jensen, T., Itoh, Y., & Couchman, J. R. (2010). Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J*, *277*(19), 3876-3889. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07798.x
- Migliozzi, M. T., Mucka, P., & Bielenberg, D. R. (2014). Lymphangiogenesis and metastasis--a closer look at the neuropilin/semaphorin3 axis. *Microvasc Res*, *96*, 68-76. doi: 10.1016/j.mvr.2014.07.006
- Mitra, A., Mishra, L., & Li, S. (2015). EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget*, *6*(13), 10697-10711. doi: 10.18632/oncotarget.4037
- Mjaatvedt, C. H., & Markwald, R. R. (1989). Induction of an epithelial-mesenchymal transition by an in vivo adheron-like complex. *Dev Biol*, *136*(1), 118-128. doi: 10.1016/0012-1606(89)90135-8
- Nathanson, S. D. (2003). Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*, *98*(2), 413-423. doi: 10.1002/cncr.11464
- Nistico, P., Bissell, M. J., & Radisky, D. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(2). doi: 10.1101/cshperspect.a011908
- Nollet, F., Kools, P., & van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, *299*(3), 551-572. doi: 10.1006/jmbi.2000.3777
- Norregaard, R., Kwon, T. H., & Frokiaer, J. (2015). Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. *Kidney Res Clin Pract*, *34*(4), 194-200. doi: 10.1016/j.krcp.2015.10.004

- Olson, E. N., & Capetanaki, Y. G. (1989). Developmental regulation of intermediate filament and actin mRNAs during myogenesis is disrupted by oncogenic ras genes. *Oncogene*, 4(7), 907-913.
- Ozawa, M., Hoschutzky, H., Herrenknecht, K., & Kemler, R. (1990). A possible new adhesive site in the cell-adhesion molecule uvomorulin. *Mech Dev*, 33(1), 49-56. doi: 10.1016/0925-4773(90)90134-8
- Padera, T. P., Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C. M., Brown, E. B., Boucher, Y., . . . Jain, R. K. (2002). Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, 296(5574), 1883-1886. doi: 10.1126/science.1071420
- Palaiologou, M., Delladetsima, I., & Tiniakos, D. (2014). CD138 (syndecan-1) expression in health and disease. *Histol Histopathol*, 29(2), 177-189. doi: 10.14670/HH-29.177
- Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3481-3498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026
- Papageorgis, P. (2015). TGFbeta Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. *J Oncol*, 2015, 587193. doi: 10.1155/2015/587193
- Pegoraro, A. F., Janmey, P., & Weitz, D. A. (2017). Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(11). doi: 10.1101/cshperspect.a022038
- Philip, B., Ito, K., Moreno-Sanchez, R., & Ralph, S. J. (2013). HIF expression and the role of hypoxic microenvironments within primary tumours as protective sites driving cancer stem cell renewal and metastatic progression. *Carcinogenesis*, 34(8), 1699-1707. doi: 10.1093/carcin/bgt209
- Piedra, J., Martinez, D., Castano, J., Miravet, S., Dunach, M., & de Herreros, A. G. (2001). Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 276(23), 20436-20443. doi: 10.1074/jbc.M100194200
- Redies, C., Vanhalst, K., & Roy, F. (2005). delta-Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci*, 62(23), 2840-2852. doi: 10.1007/s00018-005-5320-z
- Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. (2016). *J Biol Chem*, 291(21), 11463. doi: 10.1074/jbc.A116.100194
- Rimm, D. L., & Morrow, J. S. (1994). Molecular cloning of human E-cadherin suggests a novel subdivision of the cadherin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 200(3), 1754-1761. doi: 10.1006/bbrc.1994.1656
- Samatov, T. R., Tonevitsky, A. G., & Schumacher, U. (2013). Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Mol Cancer*, 12(1), 107. doi: 10.1186/1476-4598-12-107
- Savagner, P. (2010). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol*, 21 Suppl 7, vii89-92. doi: 10.1093/annonc/mdq292
- Scheel, C., & Weinberg, R. A. (2012). Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*, 22(5-6), 396-403. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.04.001
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(10), 611-629. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44
- Sleeman, J. P., Cady, B., & Pantel, K. (2012). The connectivity of lymphogenous and hematogenous tumor cell dissemination: biological insights and clinical implications. *Clin Exp Metastasis*, 29(7), 737-746. doi: 10.1007/s10585-012-9489-x
- Su, J., Yin, X., Zhou, X., Wei, W., & Wang, Z. (2015). The functions of F-box proteins in regulating the epithelial to mesenchymal transition. *Curr Pharm Des*, 21(10), 1311-1317. doi: 10.2174/1381612821666141211144203
- Teng, Y. H., Aquino, R. S., & Park, P. W. (2012). Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol*, 31(1), 3-16. doi: 10.1016/j.matbio.2011.10.001
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6), 442-454. doi: 10.1038/nrc822

- Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M., & Christofori, G. (2012). EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol*, 22(3), 194-207. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.02.013
- Tsai, J. H., & Yang, J. (2013). Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev*, 27(20), 2192-2206. doi: 10.1101/gad.225334.113
- Tsuji, T., Ibaragi, S., Shima, K., Hu, M. G., Katsurano, M., Sasaki, A., & Hu, G. F. (2008). Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res*, 68(24), 10377-10386. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1444
- van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65(23), 3756-3788. doi: 10.1007/s00018-008-8281-1
- Warzecha, C. C., & Carstens, R. P. (2012). Complex changes in alternative pre-mRNA splicing play a central role in the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Semin Cancer Biol*, 22(5-6), 417-427. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.04.003
- Wittekind, C. (2000). Diagnosis and staging of lymph node metastasis. *Recent Results Cancer Res*, 157, 20-28. doi: 10.1007/978-3-642-57151-0_3
- Wong, S. Y., & Hynes, R. O. (2006). Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle*, 5(8), 812-817. doi: 10.4161/cc.5.8.2646
- Wu, C. Y., Tsai, Y. P., Wu, M. Z., Teng, S. C., & Wu, K. J. (2012). Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial-mesenchymal transition. *Trends Genet*, 28(9), 454-463. doi: 10.1016/j.tig.2012.05.005
- Yao, H., Wu, H., & Liu, Y. (2017). [Improvement of prognostic and predictive network of colorectal cancer based upon the 8th edition of AJCC colorectal cancer staging system]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 20(1), 24-27.
- Zheng, H., & Kang, Y. (2014). Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene*, 33(14), 1755-1763. doi: 10.1038/onc.2013.128

ANEXOS



1 ANEXOS



SERVICIO DE SALUD
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS

Comité de Ética de la Investigación del
Principado de Asturias
Avda. de Roma s/n
33011-Oviedo
Tfno: 986.10.79.27985.10.80.24
e-mail: cei@ccimadencia.es

Área Sanitaria

Oviedo, 14 de Noviembre de 2017

El Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias, ha revisado el Proyecto de Investigación nº 163/17, titulado "ESTUDIO DE UN MODELO DE METASTASIS DE COLON A HIGADO", investigador principal: Dr. Iván Fernández Vega, S^o de Anatomía Patológica H.U.C.A.

El Comité ha tomado el acuerdo de considerar que el citado proyecto reúne las condiciones éticas necesarias para poder realizarse y en consecuencia emite su autorización.

Los Consentimientos informados deberán firmarse por duplicado (para dejar constancia de ellos) y una copia deberá ser archivada con la documentación del estudio.

Se recuerda que deberá guardarse la máxima confidencialidad de los datos utilizados en este proyecto.


Pdo. Mauricio Telenti Arensio
Secretario del Comité de Ética de la Investigación
del Principado de Asturias



BURSARY

The abstract

Study of a metastatic colon cancer model to the liver: Clinicopathological results

presented by

Adela Alonso Fernández-Velasco

during the

29th European Congress of Pathology

has been awarded a

Bursary


Prof. Pierre Bedossa

President of the European Society of Pathology

PS-13-004

Study of a metastatic colon cancer model to the liver: Clinicopathological results

A. Alonso Fernández-Velasco*, R. Ugalde Herrá, M. P. González Gutiérrez, M. González Guerrero, I. Husain Calzada, I. Fernández Vega
*Hospital Universitario Central de Asturias, Avilés, Spain

Objective: This study aimed to analyze clinicopathological features of 57 patients that developed adenocarcinomas in the colon with progression to liver metastasis.

Method: Fifty-seven colon adenocarcinomas (CA) and their respective hepatic metastatic adenocarcinomas (MA) were microscopically examined. Diverse histological parameters such as necrosis, mitotic activity, grade of differentiation, inflammation, tumour buds... were analyzed. Clinical data such as survival rates and demographic parameters were also recollected.

Results: Our database is composed of 38 men and 19 women with a mean age of 66.2 ± 9.6 years. About 79 % of cases were from the left colon. Histopathologically, almost 89 % CA presented tumour buds and almost 52 % showed metastatic regional lymph nodes on diagnosis. The tumoural grade was higher in CA (1.8/3 in CA vs 1.6/3 in MA); mitotic activity per 10HPF was almost equal (35 ± 22 in CA vs 34 ± 20 in MA); intratumoural necrosis was significantly higher in MA (3.6/4 in MA vs 2.0/4 in CA). Minimal differences were observed concerning peritumoural chronic inflammation (1.3/4 in CA vs 1.2/4 in MA). Statistically, presence of tumour buds in CA correlated with lower progression-free survival ($p = 0.013$).

Conclusion: We have described relevant histopathological differences between CA and MA. Tumour buds in CA correlated with lower progression-time survival.

DIPLOMA
COMUNICACIONES XLI REUNIÓN ANUAL SEAP-IAP

TRABAJO: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL FAK EN UN MODELO DE METÁSTASIS DE ADENOCARCINOMA DE COLON A HÍGADO CON 52 PACIENTES.

AUTORES: Adela Alonso Fernández-Velasco¹, Daniela Corte-Torres², Aitana Vallina², Imran Husain-Calzada¹ e Iván Fernández-Vega^{1,2,3}.

HOSPITAL: 1) Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias. 2) Biobanco del Principado de Asturias (BPA). 3) Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Presentado en la Sesiones Científicas de la XLI Reunión Anual de la Sociedad Española de Anatomía Patológica, los días 15 y 16 de febrero de 2018.

Para que conste a los efectos oportunos, se firma en Madrid a 16 de febrero de 2018

EL SECRETARIO

Dr. Federico Rojo Todo



DIPLOMA
COMUNICACIONES XLI REUNIÓN ANUAL SEAP-IAP

TRABAJO: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA EN UN MODELO DE METÁSTASIS DE ADENOCARCINOMA DE COLON A HÍGADO CON 52 PACIENTES.

AUTORES: Adela Alonso Fernández-Velasco¹, Daniela Corte-Torres², Aitana Vallina², Imran Husain-Calzada¹, Rodrigo Ugalde-Herrá¹, y Iván Fernández-Vega^{1,2,3}.

HOSPITAL: 1) Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias. 2) Biobanco del Principado de Asturias (BPA). 3) Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Presentado en la Sesiones Científicas de la XLI Reunión Anual de la Sociedad Española de Anatomía Patológica, los días 15 y 16 de febrero de 2018.

Para que conste a los efectos oportunos, se firma en Madrid a 16 de febrero de 2018

EL SECRETARIO

Dr. Federico Rojo Todo





Abstracts

30th European Congress of Pathology

PS-20-044

STAT6 immunorexpression in samples from a metastatic model of colon adenocarcinomas to the liver reveals a group of patients with better prognosis

A. Alonso Fernández-Velasco¹, D. Corte-Torres, A. Vallina, I. Husain Calzada, S. J. Sánchez Luizaga, L. Pérez Pavón, M. B. Álvarez González, R. Ugalde Herrá, I. Fernández Vega
¹Hospital Central de Asturias, Anatomía Patológica, Oviedo, Spain

Background & Objective: STAT6 protein plays a central role in exerting IL4 mediated biological responses. Moderate to strong cytoplasmic and nuclear staining was observed in most tumour cells, such as colon cancer cells. The main objective was to study the expression of STAT6 in samples of colon adenocarcinoma and in their respective hepatic metastases and to study their clinical relevance with survival rates.

Method: Fifty-two consecutive patients with colon cancer and subsequent hepatic metastasis surgically removed between 2007 and 2017 were studied. Tissue arrays were produced using a 2 mm diameter needle. Immunohistochemical studies were conducted, where the positivity was classified from 1 to 3 degrees and the extension was graded between 0 and 100%. A global score was obtained by multiplying both values. Statistical analysis of these findings was carried out using the SPSSv23; p<0.05 program.

Results: Almost all colon adenocarcinoma samples and 90% of metastatic samples showed different degrees of STAT6 positive immunorexpression. No significant differences in STAT6 immunorexpression were noted between primary tumours and their metastatic samples (74.41 vs 73.48 p=0.835). Interestingly, metastatic samples of colon adenocarcinomas with more than 100 points of STAT6 immunorexpression reveals a group of patients with significantly better overall survival, disease-free time and post metastatic survival (p=0,001; p=0,006; p=0,004 respectively).

Conclusion: No significant differences for STAT6 were found between primary and metastatic adenocarcinoma samples. Considering metastatic adenocarcinoma samples, those with more than 100 points of immunorexpression for STAT6 reveals a group of patients with better prognosis.

PS-20-045

STATB2 reveals a group of patients with better prognosis in a metastatic model of colon adenocarcinomas to the liver

A. Alonso Fernández-Velasco¹, D. Corte-Torres, A. Vallina, I. Husain Calzada, S. J. Sánchez Luizaga, L. Pérez Pavón, M. B. Álvarez González, R. Ugalde Herrá, I. Fernández Vega
¹Hospital Central de Asturias, Anatomía Patológica, Oviedo, Spain

Background & Objective: The expression of SATB2 protein is primarily preserved in cancer cells of colorectal origin, indicating that SATB2 could function as a clinically useful diagnostic marker to distinguish colorectal cancers from others. To study the expression of SATB2 in samples of colon adenocarcinoma (52) and their respective hepatic metastases and to study their clinical relevance with survival rates.

Method: Fifty-two consecutive patients with colon cancer and subsequent hepatic metastasis surgically removed between 2007 and 2017 were studied. Tissue arrays were produced using a 2 mm diameter needle. Immunohistochemical studies were conducted, where the positivity was classified from 1 to 3 degrees and the extension was graded between 0 and 100%. A global score was obtained by multiplying both values. Statistical analysis of these findings was carried out using the SPSSv23; p<0.05 program.

Results: More than 90% of colon adenocarcinoma samples and their respective metastatic tumours showed different degrees of SATB2 positive immunorexpression. A significant overexpression of SATB2 in the metastatic colon adenocarcinoma was noted (175.3 vs 125.0; p=0.009). Additionally, a significant inverse correlation between the number of positive regional lymph nodes and SATB2 expression was observed (r=-0.390; p=0.013). Finally, samples with more than 150 points of SATB2 immunorexpression reveals a group of patients with better overall survival, disease-free time and post metastatic survival (p=0,021; p=0,041; p=0,034 respectively).

Conclusion: Significant differences for SATB2 immunorexpression were noted between primary and metastatic adenocarcinoma samples. Colon adenocarcinomas with more than 150 points of SATB2 immunorexpression reveals a group of patients with better prognosis.

PS-20-046

The absence of COX2 immunorexpression in samples from a metastatic model of colon adenocarcinomas to the liver reveals a group of patients with poorer prognosis

A. Alonso Fernández-Velasco¹, D. Corte-Torres, A. Vallina, I. Husain Calzada, S. J. Sánchez Luizaga, L. Pérez Pavón, M. B. Álvarez González, R. Ugalde Herrá, I. Fernández Vega
¹Hospital Central de Asturias, Anatomía Patológica, Oviedo, Spain

Background & Objective: COX-2 is an inducible enzyme, making it undetectable in the majority of tissues under basal conditions. The overexpression of COX-2, both in epithelial cells and in adjacent stroma, suggests that the derived prostaglandins may be promoting tumour development in the colon. To study the immunorexpression of COX-2 in samples of colon adenocarcinoma and their respective hepatic metastases and to study their clinical relevance with survival rates.

Method: Fifty-two consecutive patients with colon cancer and subsequent hepatic metastasis surgically removed between 2007 and 2017 were studied. Tissue arrays were produced using a 2 mm diameter needle. Immunohistochemical studies were conducted, where the positivity was classified from 1 to 3 degrees and the extension was graded between 0 and 100%. A global score was obtained by multiplying both values. Statistical analysis of these findings was carried out using the SPSSv23; p<0.05 program.

Results: Positive immunorexpression for COX-2 was detected in almost 80% of primary tumours and in 90% of their metastasis. A significant overexpression of COX-2 in the metastatic samples was noted (67.5 vs 40.16; p=0.019). Moreover, a positive correlation between the COX-2 expression and the disease-free time was found (r= 0.304; p=0,041). A negative expression of COX2 in the primary colon adenocarcinomas showed a group of patients with a significant lower overall survival, disease-free time and post-metastatic survival (p=0,01; p=0,006; p=0,016 respectively).

Conclusion: Significant differences for COX-2 were noted between primary and metastatic adenocarcinoma samples. The absence of COX2 expression reveals a group of patients with a poorer prognosis.

E-PS-06-020

Study of MUC5AC, C-MET and SOX9 immunorexpression in a metastatic model of colon adenocarcinomas to the liver

A. Alonso Fernández-Velasco¹, D. Corte-Torres, A. Vallina, I. Husain Calzada, S. J. Sánchez Luizaga, L. Pérez Pavón, M. B. Álvarez González, R. Ugalde Herrá, I. Fernández Vega
¹Hospital Central de Asturias, Anatomía Patológica, Oviedo, Spain

Background & Objective: MUC5AC is a protein usually absent in normal colon and colorectal adenocarcinomas (CRC). C-MET is overexpressed in primary CRC and it is described as an important prognostic marker for early stage invasion and regional metastatic disease. Finally, SOX-9 is described as an independent adverse prognosticator in CRC. The main objective was to study the expression of MUC5AC, C-MET and SOX9 in samples of colon adenocarcinoma (52) and their respective hepatic metastases.

Method: Fifty-two consecutive patients with colon cancer and subsequent hepatic metastasis surgically removed between 2007 and 2017 were studied. Tissue arrays were produced using a 2 mm diameter needle. Immunohistochemical studies were conducted, where the positivity was classified from 1 to 3 degrees and the extension was graded between 0 and 100%. A global score was obtained by multiplying both values. Statistical analysis of these findings was carried out using the SPSSv23; p<0.05 program.

Results: Positive immunorexpression was noted in almost 35% of colon adenocarcinoma samples for MUC5AC, 37% for C-MET and more than 95% for SOX-9. In comparison, 25% of their respective metastatic tumours showed positivity for MUC5AC, up to 70% for C-MET and 100% for SOX-9. Furthermore, a significant overexpression of MUC5AC in primary adenocarcinomas was found (26.77 vs 5.77; p=0,045), while a significant overexpression of C-MET (25.03 vs 15.44; p=0,07) and SOX-9 (284.76 vs 253.75; p=0,039) was observed in metastatic adenocarcinomas.

Conclusion: Significant differences for MUC5AC, C-MET and SOX-9 were found between primary colon adenocarcinomas and their respective liver metastasis.