



# Análisis de la Proteína de Activación de Fibroblastos $\alpha$ (FAP) en el Carcinoma Colorrectal

Tesis Doctoral

Jon Danel Solano Iturri

Directores:

Gorka Larrinaga Enbeita / Iker Badiola Echaburu

Leioa, 2019



## **AGRADECIMIENTOS:**

A Gorka Larrinaga, Iker Badiola, Maider Beitia, Peio Errarte, Julio Calvete e Iñaki López. Más allá de haberme facilitado conocimiento científico y medios técnicos vuestra paciencia, dedicación, esfuerzo, disponibilidad e ilusión han sido estímulo constante para la realización de este trabajo. Muchas gracias por haber podido formar parte de vuestro equipo.

A Aitor Fernández de Larrinoa, Carla Valentí, Ayman Gaafar, Ena Fernández-Lomana, Aitziber Marcos, Dámaso Parrón, Laura Zaldumbide, Elena Fuertes, Gonzalo García de Casasola, Eva García, Ana Olalde, Yoseba Aberasturi, Ane Gartzia, Ignacio Díaz de Lezcano, Álex Nogueira, Igone Imaz, Eduardo De Miguel, "Tanino" Alioto, Josune Jubindo, Ainara Egia y Maru Yubero. Gracias por vuestra excelente acogida y disponibilidad allí donde he tenido la suerte de poder desarrollar mi labor profesional. Desde vuestros sencillos y silenciosos despachos me habéis transmitido la confianza para opinar, debatir, aprender de los errores, disfrutar y anteponer las necesidades del paciente a los intereses propios.

A los Hospitales de Basurto y Cruces y a la Facultad de Medicina y Enfermería de la UPV/EHU que me han permitido aprender y desarrollar mi actividad profesional.

A todos los pacientes que con la cesión voluntaria y desinteresada de sus muestras han posibilitado desarrollar este estudio.

Todos sois artífices de este trabajo. Que las conclusiones del mismo ayuden un poquito más a aliviar el sufrimiento de los que hoy en día padecen la enfermedad y de los que en un futuro pudieran o pudiéramos padecerla.



# RESUMEN

El carcinoma colorectal (CCR) es la tercera neoplasia maligna más frecuente a nivel mundial. La mayor esperanza de vida, dietas fundamentadas en carne roja procesada, el sedentarismo, la patología inflamatoria crónica intestinal y la predisposición genética contribuyen al desarrollo de más de 35.000 nuevos casos anuales en España.

La instauración de programas de cribado poblacional ha permitido incrementar el número de casos diagnosticados de forma precoz en los últimos años. Sin embargo, el número de fallecimientos anuales por esta enfermedad sigue siendo superior a 10.000.

Desde finales del siglo XIX se suceden los trabajos que afirman que en el cáncer en general y en el CCR en particular, además de la célula maligna proliferante, existe una continua interacción de células y elementos químicos señalizadores que constituyen un microambiente tumoral que influye en el desarrollo del mismo.

En la última década se han intensificado los estudios que tratan de definir el rol de un grupo de células participantes del microambiente tumoral: los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). Estas células de estirpe mesenquimatosas son capaces de inducir, entre otros, cambios de desdiferenciación fenotípica en la célula epitelial proliferante, mecanismos de adaptación metabólica de la célula tumoral al medio y sistemas de modulación de la respuesta inmune del huésped con el fin de favorecer el crecimiento local y la expansión a distancia de la tumoración. Para ello, se sirven de factores de transcripción, quimiocinas y otro tipo de proteínas expresadas en su membrana celular.

Una de esas proteínas expresadas por los CAFs es la Proteína de Activación de Fibroblastos  $\alpha$  (FAP). FAP es una proteína transmembrana con actividad enzimática dipeptidil peptidasa y endopeptidasa y actividad no catalítica que se expresa en CAFs de múltiples lesiones carcinomatosas, en muchas de las cuales parece adquirir un valor pronóstico negativo. Es el caso del carcinoma renal, en el que la expresión de FAP en estudios previos realizados por este grupo de trabajo se ha relacionado, por ejemplo, con una menor supervivencia.

Esta tesis doctoral pretende, por tanto, definir el papel que desempeña FAP en las diferentes etapas evolutivas del CCR, desde su estado preinvasivo en forma de adenoma hasta su etapa metastásica final.

Para ello se exponen los resultados y conclusiones obtenidas de la expresión inmunohistoquímica de FAP en muestras histológicas de mucosa no tumoral de intestino grueso, pólipo adenomatoso y CCR de diferentes subtipos histológicos además de la cuantificación de la fracción soluble de FAP (FAPs) en plasma de pacientes con CCR. Todo ello se complementa con un análisis de las posibles interacciones existentes entre FAP y otros marcadores de microambiente tumoral representados en el programa de transición epitelio-mesénquima (EMT), conservación del fenotipo de célula madre y proliferación celular.

Este estudio corrobora la expresión positiva de FAP en el estroma tumoral, si bien esta inmunoexpresión es significativamente mayor en el adenocarcinoma convencional (AdC) que en otras variantes histológicas como son el adenocarcinoma mucinoso (MuC) y el adenocarcinoma de células en anillo de sello (SrcC). A lo largo de la secuencia evolutiva se apreció mayor inmunoexpresión en el tumor primario de AdC que en las metástasis. Además, aquellos pacientes que expresaban en el frente de infiltración y en el ganglio linfático de forma simultánea FAP en CAFs y  $\beta$ -Catenina en el núcleo de las células tumorales parecían mostrar peor pronóstico. Se pudo determinar, asimismo, que los niveles plasmáticos de la FAPs eran inferiores en pacientes con AdC que en controles sanos y que unos niveles muy bajos se asociaban con peor supervivencia de los pacientes.

De manera general se puede definir a FAP como una proteína expresada por CAFs en estadios iniciales de CCR cuya función está sujeta a la interacción de otros elementos del microambiente tumoral. Las diferencias significativas de FAPs entre pacientes con CCR y controles sanos resultan interesantes de cara a potenciar un rol de biomarcador en el curso evolutivo de la enfermedad.

## **ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS:**

AdC: Adenocarcinoma convencional

AVCs: Células Vasculares Angiogénicas

$\beta$ CAT: Betacatenina

bFGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico básico

CAFs: Fibroblastos Asociados al Cáncer

CAP: Colegio Americano de Patólogos

CCR: Carcinoma Colorrectal

CEA: Antígeno Carcinoembrionario

CNI: Inestabilidad Cromosómica

CSC: Células madre cancerosas

CSS: Supervivencia Cáncer-Específica

CTGF: Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo

DFS: Supervivencia libre de enfermedad

DPP: Dipeptidil peptidasa

DR: Reacción Desmoplásica

EGFR: Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

EMT: Transición Epitelio-Mesénquima

FAP: Proteína de Activación de Fibroblastos  $\alpha$

H&E: Hematxilina y Eosina

HIF-1: Factor Inducible por Hipoxia-1

HGF: Factor de Crecimiento Hepatocitario

IICs: Células Inflammatorias Infiltrantes

IL: Interleucina

IMS: Inestabilidad de Microsatélites

INF  $\gamma$ : Interferón  $\gamma$

LT: Linfocito T

MEC: Matriz Extracelular

MuC: Adenocarcinoma mucinoso

MMR: Sistema de reparación de errores en el DNA

NAFs: Fibroblastos Asociados al Tejido Sano

NPY: Neuropeptido Y

PDCs: Agregados Celulares Pobremente Diferenciados

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

SrcC: Adenocarcinoma de células en anillo de sello

TGF $\beta$ : Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$

TMA: Micromatriz de Tejido

VEGF: Factor Vascular de la Célula Endotelial



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 INTESTINO GRUESO: ANATOMÍA, HISTOLOGÍA y FUNCIONES.....	1
1.2 CARCINOMA COLORRECTAL.....	5
1.2.1 Epidemiología.....	5
1.2.2 Carcinogénesis molecular.....	7
1.2.3 Diagnóstico y pronóstico.....	9
1.2.4 Tratamiento.....	11
1.2.5 Subtipos histológicos de CCR.....	12
1.3 MICROAMBIENTE TUMORAL.....	14
1.3.1 Células Vasculares Angiogénicas.....	16
1.3.2 Células Inflamatorias Infiltrantes.....	17
1.3.3 Fibroblastos Asociados al Cáncer (CAFs).....	18
1.4 PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS $\alpha$ (FAP $\alpha$ ).....	25
1.4.1 Concepto.....	25
1.4.2 Función.....	26
1.4.3 Expresión de FAP en neoplasias.....	30
1.4.4 La FAP como potencial diana terapéutica.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
3.1 SELECCIÓN DE CASOS.....	34
3.2 EXPRESIÓN PROTEICA.....	39
3.2.1 Construcción de TMA.....	39
3.2.2 Estudio Inmunohistoquímico.....	41
3.3 ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL PROGRAMA EMT.....	44
3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FAPs EN PLASMA.....	46
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1 EXPRESIÓN DE FAP EN LAS SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA.....	48
4.2 EXPRESIÓN DE FAP EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CCR.....	49
4.3 EXPRESIÓN DE FAP EN LA SECUENCIA TUMOR PRIMARIO-METÁSTASIS Y SU ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICO-	

PATOLÓGICOS DE CCR.....	51
4.3.1 Análisis de FAP en la secuencia tumor primario- metástasis.....	51
4.3.2 Expresión de FAP y su asociación con variables clínicas y patológicas.....	53
4.3.3 Estudio del programa EMT en el AdC.....	60
4.4 ESTUDIO DE FAP Y OTROS MARCADORES DE MICROAMBIENTE TUMORAL.....	63
4.5 ESTUDIO DE FAP SOLUBLE EN PLASMA DE PACIENTES CON AdC..	69
5. DISCUSIÓN.....	73
5.1 EXPRESIÓN DE FAP EN LA SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA..	73
5.2 EXPRESIÓN DE FAP EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CCR.....	75
5.3 EXPRESIÓN DE FAP EN LA SECUENCIA TUMOR PRIMARIO- METÁSTASIS Y SU ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICO- PATOLÓGICOS DE CCR.....	77
5.3.1 Análisis de FAP en la secuencia tumor primario- metástasis.....	77
5.3.2 Expresión de FAP y su asociación con variables clínicas y patológicas.....	79
5.3.3 FAP y el programa EMT.....	80
5.4 ANÁLISIS DE FAP Y OTROS MARCADORES DE MICROAMBIENTE TUMORAL.....	82
5.5 ANÁLISIS DE FAP SOLUBLE EN PLASMA DE PACIENTES CON CCR.....	84
5.6 PERSPECTIVAS DE FUTURO Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....	86
6. CONCLUSIONES.....	88
REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	89
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Ilustración anatómica del Intestino Grueso desde su origen en la unión ileo-cólica hasta el canal anal.....	1
Figura 1.2 Distribución arquitectural histológica de los estratos de la pared del intestino grueso.....	3
Figura 1.3 Distribución de los diferentes tipos de células de la mucosa del intestino grueso.....	5
Figura 1.4 Ilustración de los cambios morfológicos y genéticos en la secuencia adenoma-carcinoma.....	8
Figura 1.5 Imágenes microscópicas de subtipos histológicos de CCR.....	14
Figura 1.6 Comparación entre vascularización fisiológica de tejido sano y neoproliferación angiogénica de tejido tumoral.....	16
Figura 1.7 Ilustración del proceso de inmunomodulación tumoral.....	17
Figura 1.8 Activación de fibroblastos asociados al cáncer (CAFs).....	20
Figura 1.9 Programa de transición epitelio-mesénquima (EMT).....	24
Figura 1.10 Estructura de FAP.....	25
Figura 1.11 Actividad enzimática de FAP.....	27
Figura 1.12 Actividad enzimática de FAP en la matriz extracelular del microambiente tumoral.....	28
Figura 1.13 Ilustración de la modulación protumoral de FAP sobre el sistema inmunitario.....	29
Figura 1.14 Ilustración de posibles mecanismos de FAP de acción conjunta protumoral.....	30
Figura 3.1 Tallado macroscópico de pieza de CCR (Hemicolectomía derecha).....	34
Figura 3.2 Curvas de supervivencia cáncer-específica de la serie de estudio de CCR avanzado según test de Log-Rank.....	37
Figura 3.3 Ilustración de la selección de áreas del tumor primario a incluir en los TMAs.....	39
Figura 3.4 Ilustración de la construcción de TMAs.....	40
Figura 3.5 Imagen histológica de Budding tumoral y comparación con PDC.....	44
Figura 3.6 Imagen histológica de los diferentes tipos de estroma peritumoral descritos.....	45

Figura 4.1 Expresión inmunohistoquímica de FAP a lo largo de la secuencia adenoma-carcinoma.....	49
Figura 4.2 Expresión inmunohistoquímica de FAP en los subtipos histológicos AdC, MuC y SrcC en las localizaciones de centro de tumor, borde de infiltración, metástasis en ganglio linfático locorregional y metástasis hepática a distancia.....	50
Figura 4.3 Expresión inmunohistoquímica de FAP en las diferentes estaciones evolutivas del AdC.....	52
Figura 4.4 Expresión inmunohistoquímica de FAP según grado histológico.....	53
Figura 4.5 Expresión inmunohistoquímica de FAP según invasión local (pT).....	54
Figura 4.6 Expresión inmunohistoquímica de FAP según invasión locorregional (pN).....	55
Figura 4.7 Expresión inmunohistoquímica de FAP según metástasis a distancia (M).....	56
Figura 4.8 Expresión inmunohistoquímica de FAP según estadio.....	57
Figura 4.9 Estudio de PDC y DR según estadio.....	60
Figura 4.10 Estudio de PDC y DR según pT.....	61
Figura 4.11. Ilustración de las diferentes combinaciones de marcadores inmunohistoquímicos de microambiente tumoral.....	63
Figura 4.12. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia cáncer-específica en pacientes con AdC en base a la combinación de FAP+ y $\beta$ -Catenina nuclear.....	66
Figura 4.13. Expresión inmunohistoquímica de FAP y $\beta$ -Catenina en frente de infiltración tumoral y ganglio linfático.....	68
Figura 4.14. Niveles de FAPs en plasma de sujetos controles sanos y pacientes con AdC.....	69
Figura 4.15. Supervivencia cáncer-específica en pacientes con AdC en base a niveles de FAP.....	71
Figura S1. Imágenes de tinciones inmunohistoquímicas de FAP, $\beta$ -Catenina, CD44 y Ciclina D1.....	124
Figura S2. Valores de corte para determinación de supervivencia cáncer-específica según método CRT.....	125

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Parámetros clínico-patológicos de los pacientes con CCR avanzado seleccionados para los análisis inmunohistoquímicos.....	36
Tabla 3.2. Características clínico-patológicas de la serie para el análisis de la fracción soluble de la FAP.....	38
Tabla 3.3. Anticuerpos utilizados en la detección proteica mediante IHQ y sus condiciones de optimización protocolaria.....	41
Tabla 3.4. Criterios de valoración IHQ de los diferentes marcadores utilizados.....	43
Tabla 3.5. Sistema de categorización de PDC y DR y la gradación resultante de la combinación de ambos.....	45
Tabla 4.1. Supervivencia cáncer-específica de los pacientes afectados por Adc según inmunoexpresión de FAP.....	58
Tabla 4.2 Supervivencia libre de enfermedad de los pacientes afectados por AdC según inmunoexpresión de FAP.....	59
Tabla 4.3. Estudio de PDC y DR según grado histológico.....	62
Tabla 4.4. Estudio de PDC según FAP.....	62
Tabla 4.5. Estudio de DR según FAP.....	63
Tabla 4.6. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y BCAT nuclear en el frente de infiltración.....	64
Tabla 4.7. Resultados del test Log-rank para la asociación de FAP+/β-Catenina nuclear, FAP+/CD44 alto y FAP+/Ciclina D1 alto respecto a la supervivencia cáncer-específica y tiempo libre de enfermedad a 60 y 120 meses en los pacientes con AdC.....	65
Tabla 4.8. Análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/βCAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario para predecir supervivencia cáncer-específica a los 5 años.....	67
Tabla 4.9. Análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/βCAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario y metástasis en ganglio linfático para predecir tiempo libre de enfermedad a los 5 años.....	68
Tabla 4.10. Niveles de FAPs según parámetros clínico-patológicos en pacientes con AdC.....	70

Tabla 4.11. Análisis multivariante (Modelo de Regresión de Cox) de variables clínico-patológicas y FAPs en pacientes con AdC para la predicción de supervivencia cáncer-específica.....	72
Tabla S1. Estadificación AJCC (American Joint Comitee on Cancer) del CCR (8ª edición).....	111
Tabla S2. Categorización del grado histológico AJCC (American Joint Comitee on Cancer) del CCR (8ª edición).....	112
Tabla S3. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y BCAT nuclear en el centro del tumor primario.....	113
Tabla S4. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y BCAT nuclear en la metástasis en ganglio linfático locorregional.....	114
Tabla S5. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CD44 alto en el centro del tumor primario.....	115
Tabla S6. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CD44 alto en el frente de infiltración del tumor primario.....	116
Tabla S7. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CD44 alto en la metástasis en ganglio linfático locorregional.....	117
Tabla S8. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CiclinaD1 alto en el centro del tumor primario.....	118
Tabla S9. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CiclinaD1 alto en el frente de infiltración del tumor primario.....	119
Tabla S10. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CiclinaD1 alto en la metástasis en ganglio linfático locorregional.....	120
Tabla S11. Análisis univariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/ $\beta$ CAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario para predecir supervivencia global a los 5 años.....	121

Tabla S12. Análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/ $\beta$ CAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario y metástasis en ganglio linfático para predecir supervivencia cáncer-específica a los 10 años.....122

Tabla S13. Análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/ $\beta$ CAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario y metástasis en ganglio linfático para predecir tiempo libre de enfermedad a los 10 años.....124

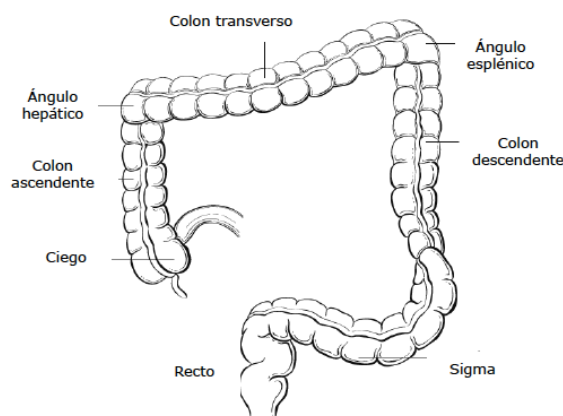




# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 INTESTINO GRUESO: ANATOMÍA, HISTOLOGÍA y FUNCIONES

El intestino grueso es un conducto tubular continuo que, integrado por el ciego, apéndice vermiforme, colon, recto y conducto anal, constituye la porción distal del tubo digestivo (1). Tradicionalmente, el término colon ha sido utilizado para referirse al conjunto formado por ciego y colon propiamente dicho lo que ha permitido subdividir anatómicamente este conducto de 80-110 cm de longitud (2) en los siguientes segmentos: ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide (Figura 1.1).



**Figura 1.1 Ilustración anatómica del Intestino Grueso desde su origen en la unión ileo-cólica hasta el canal anal.** Es interesante analizar la posición de los diferentes segmentos intestinales en base a su relación con la superficie serosa peritoneal (colon transverso, colon sigmoide y 1/3 superior de recto se encuentran completamente englobados por peritoneo; colon ascendente-colon descendente y 1/3 inferior de recto son de localización retro e infraperitoneal, respetivamente) a la hora de delimitar los márgenes quirúrgicos mesocolónico y radial (3).

Las funciones principales del intestino grueso son la reabsorción de agua y electrolitos (predominantemente en la mitad proximal) y la eliminación de los alimentos no digeridos y desechos (predominantemente en la mitad distal) (4).

Estructuralmente, cuatro son las capas que, al igual que en el resto del tubo digestivo, conforman la pared del intestino grueso: mucosa, submucosa, muscular externa y serosa (Figura 1.2).

- **Mucosa:**

Es el estrato que tapiza internamente la pared y que se encuentra, por tanto, en contacto con la luz intestinal. Delimitada en profundidad por la capa muscular de la mucosa, está revestida por células epiteliales cilíndricas absortivas y mucosecretoras que, junto a células de naturaleza enteroendocrina y células madre, se distribuyen a lo largo de las invaginaciones mucosas de arquitectura glandular denominadas Criptas de Lieberkühn. Este componente epitelial está sustentado por una matriz colágena y fibroblástica que aglutina una rica población linfoide e innumerables capilares sanguíneos que desde campos basales se extienden hasta la superficie epitelial (1).

- **Submucosa:**

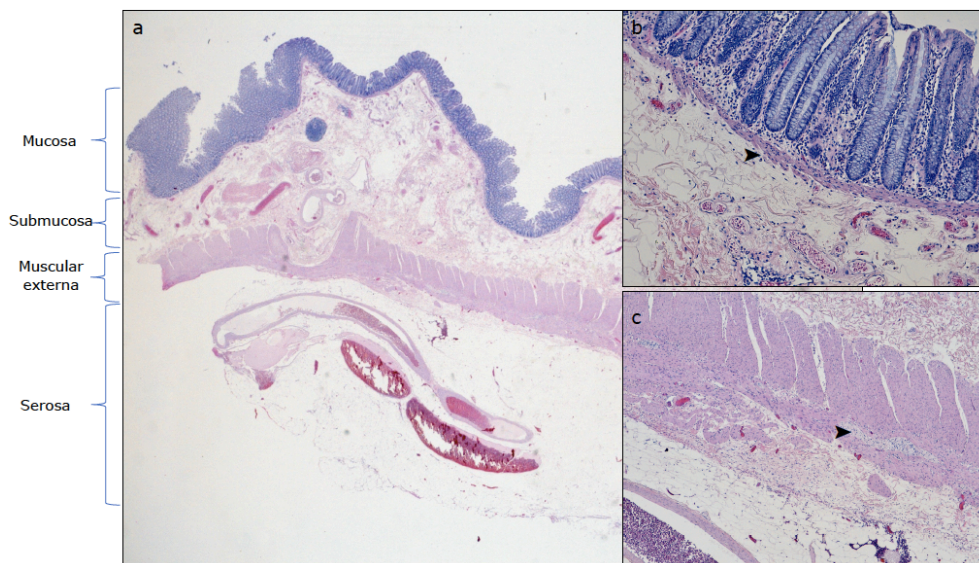
Capa de tejido colagénico en cuyo espesor se disponen vasos sanguíneos nutricios de mayor calibre, vasos linfáticos y un plexo nervioso (Plexo submucoso de Meissner), que junto al localizado en el espesor muscular es el encargado de regular la motilidad de la pared intestinal (1).

- **Muscular propia:**

Formada por una doble capa circular interna y longitudinal externa de haces de musculatura lisa, su contracción es la que permite la mezcla y avance del contenido intraluminal. En buena parte del intestino grueso la capa longitudinal externa está parcialmente condensada en bandeletas prominentes llamadas tenias (1) que periódicamente penetran en la capa circular interna para conformar unas saculaciones de contracción independiente llamadas haustras. Entre ambas capas se dispone el plexo mientérico de Auerbach (5).

- **Serosa:**

Fina almohadilla de tejido conectivo y adiposo revestida por una hilera de células mesoteliales que envuelve de manera discontinua al intestino grueso a lo largo de su longitud. Análogo al peritoneo visceral, en aquellas porciones de intestino grueso adheridas a la pared de la cavidad abdomino-pélvica (colon ascendente, colon descendente, recto y conducto anal), está reemplazada por la grasa adventicial. Sirve de sustento conductor de vasos encaminados a cubrir el aporte sanguíneo y linfático de las diferentes capas de la pared intestinal (5).



**Figura 1.2. Distribución arquitectural histológica de los estratos de la pared del intestino grueso**

(a) (H&E 4x). Representación a mayor detalle del estrato mucoso, con distribución longitudinal de criptas glandulares, y del estrato submucoso. Ambos están separados por la capa muscular de la mucosa (►) (b H&E 10x). Imagen histológica de la capa muscular propia que engloba filetes nerviosos correspondientes al plexo mientérico de Auerbach (►) (c H&E 10x) (1).

Si bien dos son los tipos de células epiteliales predominantes en la mucosa del intestino grueso, varios tipos de células se pueden identificar en su espesor (Figura 1.3):

- **Enterocitos:**

Son células columnares absorptivas especializadas en la absorción y transporte de agua y electrolitos desde la luz hasta el torrente circulatorio. Localizadas

predominantemente en la superficie luminal, su densidad disminuye progresivamente en el espesor de las criptas intestinales y en segmentos distales del intestino grueso. Se caracterizan por presentar múltiples prolongaciones microvellositarias que dan forma a un ribete apical que permite aumentar notablemente la superficie de absorción. El transporte activo mediante bombas ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{k}^+$  localizadas en la membrana plasmática lateral permite la incorporación de agua y sodio a través de su superficie apical; en consecuencia, el incremento intracelular de osmolaridad generado propicia el paso de dichas sustancias al tejido conectivo de la lámina propia a través de la membrana basal (1) (6).

- **Células caliciformes:**

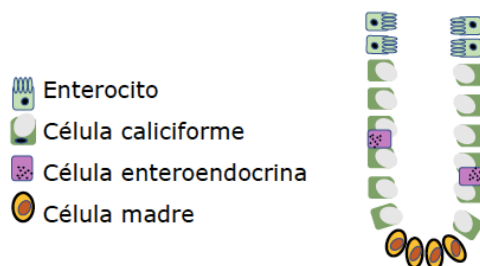
Son células productoras y secretoras de material mucoide (sulfomucinas) que lubrica la mucosa intestinal y facilita así el paso de material de desecho sólido a través de la luz intestinal. Con una presencia que se incrementa de manera progresiva en tramos distales del intestino grueso, se localizan predominantemente en el espesor de las criptas glandulares desde donde maduran y secretan de forma continua su contenido hasta alcanzar la superficie epitelial (1).

- **Células enteroendocrinas:**

Son células secretoras de hormonas que modulan diferentes funciones gastrointestinales. A pesar de encontrarse en menor cantidad que en otros segmentos del tubo digestivo, su efecto hormonal es esencial para la motilidad gastrointestinal (1) (7).

- **Células madre:**

Son células pluripotenciales agrupadas en las porciones basales de las criptas glandulares. Su capacidad autorreplicativa es la base de la diferenciación y autorrenovación del resto de poblaciones celulares descritas anteriormente (7).



**Figura 1.3. Distribución de los diferentes tipos de células de la mucosa del intestino grueso.** Si bien en todo el espesor de las criptas glandulares predomina la celularidad mucosecretora, células columnares absortivas se disponen tapizando la porción mucosa apical. De manera entremezclada pueden observarse células enteroendocrinas y células madre basales (7).

## 1.2 CARCINOMA COLORRECTAL:

### 1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA

Se denomina carcinoma colorrectal (CCR) a la neoplasia maligna originada en el epitelio de la mucosa de colon y recto. Con un total de 1.849.518 nuevos casos al año es la tercera neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada en ambos sexos a nivel mundial por detrás de los tumores malignos de mama y pulmón. Es responsable de un total de 880.792 muertes anuales (9,2% de la mortalidad por cáncer) (8).

Si bien a nivel europeo el CCR es el segundo tumor más frecuente por detrás del de mama, en España, el CCR ocupa la primera posición (22.744 nuevos casos anuales registrados en varones y 14.428 en mujeres en el año 2018).

Ya en 2020 se estima que el número de fallecimientos por carcinoma de colon ascienda a 12.865 en España (8) si bien existen a nivel mundial programas consolidados de cribado de CCR que contribuyen a un cada vez mayor diagnóstico de la lesión en estadios precoces (9).

En la Comunidad Autónoma del País Vasco en el año 2014 se registró una incidencia de 1.346 casos en hombres y 814 en mujeres (10).

Existen dos grandes grupos de factores asociados al desarrollo de carcinoma colorrectal:

- **Factores endógenos o constitucionales:**

El incremento del número de casos en personas de edad avanzada convierte a la edad en el factor de riesgo más determinante en el desarrollo de carcinoma colorrectal. La mayor incidencia en hombres que en mujeres se piensa que puede estar en relación al microambiente hormonal. La predisposición genética, así como la enfermedad inflamatoria intestinal de larga evolución parecen tener un impacto directo en el desarrollo de la enfermedad (9).

- **Factores exógenos o ambientales:**

Son aspectos relacionados con el estilo de vida. Entre ellos los de mayor influencia son: obesidad y escasa actividad física, alcohol y dietas fundamentadas en la ingesta de carne roja procesada y grasa animal. Estas dietas de hábito occidental serían las responsables de la producción de aminas heterocíclicas, incremento en la excreción de ácidos biliares, liberación de reactivos oxigenados y elevación de los niveles de insulina (9).

Por contra, dietas basadas en alimentos de origen vegetal ricos en fibra, calcio y vitamina D podrían estar relacionados con sustancias anticarcinogénicas y antioxidantes. Además, se cree que podrían inducir la liberación de enzimas detoxificantes y acelerar el tránsito intestinal que permita un menor tiempo de contacto de los agentes carcinogénicos con la superficie epitelial (9) (11). También se ha observado asociación inversamente proporcional entre el uso prolongado de antiinflamatorios no esteroideos y tratamiento estrogénico sustitutivo en mujeres respecto al CCR (11). La exposición al tabaco también se relaciona con el CCR, si bien el riesgo relativo es menor en comparación con otras neoplasias asociadas a su consumo. Menos frecuentemente se reconocen tratamientos de irradiación pélvica y ureterosigmoidostomía como causas potenciales de CCR (12) (9).

### **1.2.2 CARCINOGENESIS MOLECULAR:**

El desarrollo del CCR es consecuencia de la combinación de diferentes acontecimientos moleculares que incluyen alteraciones genéticas y epigenéticas (13). Dos son los tipos de alteraciones genéticas que inducen el desarrollo de vías carcinogénicas distintas:

- **Vía supresora o Inestabilidad cromosómica:**

Ganancias y pérdidas cromosómicas o de parte de ellos están presentes en el 85% del total de CCR (14) (12). Representan así la vía carcinogénica más frecuente en el CCR esporádico. Estas aneuploidias fundamentalmente afectan a los genes supresores de tumores (APC, p53, DCC, SMAD4,...) encargados de promover a lo largo del ciclo celular mecanismos de reparación sobre alteraciones replicativas del DNA o en su defecto inducir la senescencia de las células afectadas (13). Estas mutaciones somáticas o adquiridas tienen lugar de forma escalonada y a lo largo de años e incluso décadas. En ese espacio de tiempo la mucosa del intestino grueso sufre una serie de transformaciones histológicas cuyo reflejo endoscópico es la formación de una estructura polipoide adenomatosa que desarrollará rasgos de displasia intraepitelial de alto grado hasta alcanzar el espectro carcinomatoso infiltrante, que es en esencia el CCR (14). Es por ello por lo que al proceso carcinogénico que aglutina al conjunto de cambios morfológicos y moleculares consecuencia de esta inestabilidad cromosómica (CIN) se le conoce como Secuencia Adenoma-Carcinoma (13) (Figura 1.4).

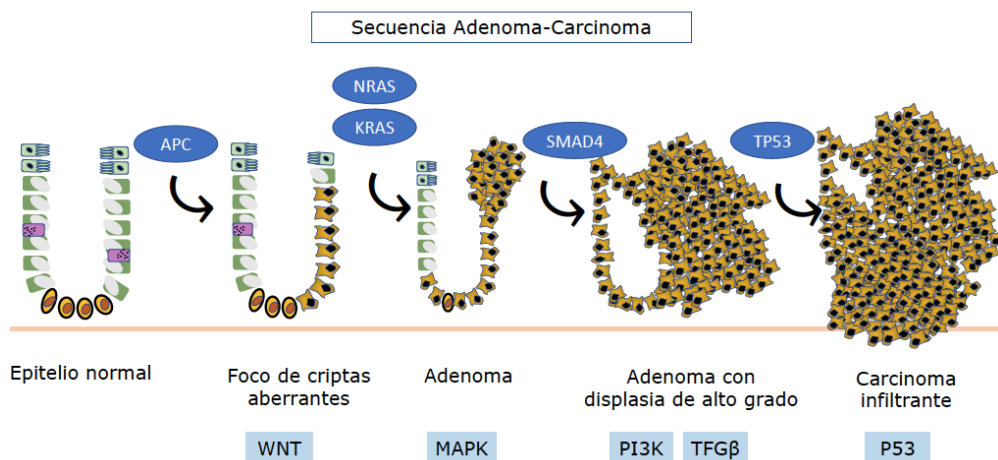
- **Vía mutadora o Inestabilidad de microsatélites:**

Deleciones e inserciones en pequeñas secuencias de nucleótidos altamente repetitivas (microsatélites) en el DNA de las células tumorales propician el desplazamiento en el marco de lectura del DNA. Existen genes supresores de tumores encargados de codificar proteínas (Mismatch Repair Proteins o proteínas MMR) cuya función es actuar en la fase S del ciclo celular para corregir desajustes en la longitud de esas secuencias altamente repetitivas. Por tanto, alteraciones en ambas copias de dichos genes supresores de tumores impiden la correcta funcionalidad de las proteínas MMR (MLH1, MSH2, PMS2 y MSH6) y por consiguiente propician el desajuste en el emparejamiento de ambas hebras de DNA de la célula. Eso conlleva el desarrollo de mutaciones sin sentido que desembocan en la codificación de proteínas truncadas. Se calcula que el 15% de los CCR se debe a la alteración del sistema MMR (14) (15).

Las alteraciones del sistema MMR pueden ser debidas a mutaciones germinales hereditarias, como ocurre en el Síndrome de Lynch (Carcinoma Colorrectal Hereditario No Polipósico) o a mecanismos de silenciamiento esporádicos de dichos genes (14).

En el primero de los casos, que corresponde aproximadamente al 3% del total de CCR, mutaciones de naturaleza autosómica dominante en los genes codificantes del sistema MMR precipitan el desarrollo de CCR a partir de un pólipo adenomatoso que comparte base carcinogénica con los CCR derivados de CIN (13) (14).

En el segundo caso, cambios de metilación aberrante sobre los dinucleótidos CpG localizados en regiones promotoras de genes condificantes de las proteínas MMR silencian su función reparadora sobre las alteraciones acumuladas en las secuencias de microsatélites (13) (14) (15). Los individuos que adoptan este perfil metilador son así más susceptibles a desarrollar CCR a partir de un pólipo serrado (Vía serrada). Hoy en día se conoce además que, en los CCR generados a través de esta vía, a diferencia de lo que ocurre en el síndrome de Lynch, es frecuente identificar mutaciones en el oncogen BRAF (14) (16).



**Figura 1.4. Ilustración de los cambios morfológicos y genéticos en la secuencia adenoma-carcinoma.** El pólipo del intestino grueso representa la primera evidencia histológica de las alteraciones genéticas y epigenéticas que acontecen en la carcinogénesis del CCR. Las mutaciones sobre genes supresores de tumores que interfieren sobre diferentes vías de señalización marcan la pauta en aquellos pólipos adenomatosos consecuencia de CIN pero también en algunos casos de Síndrome de Lynch (17). Estas mutaciones que, se cree que inicialmente acontecen sobre las células madre basales (célula originaria del CCR), son la base de la displasia intraepitelial de bajo grado, su degeneración intraepitelial adenomatosa de alto grado y posterior infiltración adenocarcinomatosa mucosa que en la mayor parte de los casos se desarrollará en un espacio de tiempo comprendido entre 10 y 15 años (18).



Los tumores desarrollados a partir de la inestabilidad de microsatélites presentan unas características clínicas e histológicas distintivas: localización proximal, asociación con otros CCR sincrónicos o metacrónicos, mayor tamaño, peor diferenciación tumoral, linfocitosis intraepitelial, patrón de crecimiento mucinoso, bordes expansivos, reacción linfoide de tipo Crohn-like, DNA diploide, mayor profundidad de invasión pero diagnóstico en estadios precoces y por consiguiente mejor pronóstico (supervivencia a los 5 años del 74% frente al 54% del resto de tumores) (19).

### **1.2.3 DIAGNÓSTICO y PRONÓSTICO**

La mayoría de CCR siguen un curso insidioso y presentan síntomas que pueden pasar desapercibidos: rectorragia con o sin anemia, dolor abdominal y cambios en las deposiciones. Los pacientes con enfermedad sistémica pueden presentar pérdida de peso y sintomatología relacionada con la disfunción hepática. No obstante, los signos y síntomas varían según la localización del tumor primario. Los tumores en segmentos proximales pueden sospecharse ante situaciones de astenia secundaria a anemia ferropénica; neoplasias en hemicolon izquierdo, sin embargo, tienen mayor riesgo de obstrucción y perforación (13) (20).

Esta sintomatología larvada y el hecho de que hasta un 75% de los CCR son diagnosticados en personas sin más factores de riesgo que la edad, hacen esencial el desarrollo de programas estandarizados de cribado en la población. Estos programas permiten detectar lesiones preinvasivas hasta 2-3 años antes del desarrollo de síntomas evidentes de infiltración neoplásica (12). En la Comunidad Autónoma del País Vasco este programa está dirigido a la población de entre 50 y 69 años por medio de la realización de un test bianual de detección de sangre oculta en heces (21).

El diagnóstico de CCR exige la realización de colonoscopia con biopsia tumoral. Tras el estudio radiológico de extensión se debe realizar extirpación quirúrgica completa de la lesión con márgenes laterales amplios ( $\geq 5$  cm) y linfadenectomía con la recomendación de aislar al menos 12 ganglios linfáticos para el estudio histológico de extensión tumoral locorregional (22). Tanto la cirugía laparoscópica como la cirugía laparotómica o abierta han mostrado resultados similares de supervivencia en colon y recto (12). Criterios de contraindicación médica, irresecabilidad o afectación más allá de la capa muscular propia en neoplasias rectales deben hacer

plantear otras estrategias terapéuticas como, por ejemplo, en el último caso, tratamiento quimioterápico neoadyuvante (9).

El estudio histopatológico de las piezas resecaadas ha sido tradicionalmente la fuente principal de factores pronóstico a tener en consideración. No obstante, factores clínico-analíticos y cada vez más frecuentemente moleculares están emergiendo con fuerza en los últimos años. Inicialmente planteados por el Colegio Americano de Patólogos (CAP), hoy en día están globalmente reconocidos y suficientemente contrastados los siguientes factores:

- **Estadio Tumoral (pTNM):**

Es el resultado de combinar el grado de infiltración mural del tumor (pT), la afectación ganglionar (pN) y la extensión a distancia (pM). Es, sin duda alguna, el factor pronóstico por excelencia del CCR. El riesgo de recurrencia se incrementa cuanto mayor sea el número de estratos de la pared y el número de ganglios linfáticos afectados por el tumor (22) (Tabla S1).

- **Grado Histológico:**

La tendencia a reproducir la configuración arquitectural del tejido sano de origen del tumor determina el grado histológico de la neoplasia. En ese sentido, aquellos CCR que estén conformados en al menos el 50% de su extensión por estructuras glandulares serán catalogados como CCR de bajo grado; por contra, un patrón glandular representado en menos del 50% del tumor será indicativo de tumor de alto grado histológico (9) (Tabla S2).

- **Subtipo Histológico:**

Las variantes mucinosa y diferenciación en anillo de sello, han sido tradicionalmente consideradas, en comparación con el Adenocarcinoma convencional, subtipos histológicos de peor pronóstico (11). Estas variantes minoritarias se asocian a alteraciones en las proteínas MMR. Pese a que, como se mencionaba anteriormente, hoy en día existen autores que exponen argumentos favorables a un mejor curso evolutivo en estos pacientes (23) (24), existe controversia acerca de la mayor o menor agresividad de estas variantes histológicas dada su tendencia a desarrollar, por ejemplo, metástasis ganglionares e implantes peritoneales (9).

- **Estado de los márgenes quirúrgicos laterales y circunferencial (retroperitoneal o mesentérico):**

La afectación de los márgenes quirúrgicos de resección incrementa significativamente el riesgo de recidiva local y disminuye la supervivencia (22).

- **Invasión Linfovascular:**

La presencia de imágenes histológicas de permeación de capilares linfáticos aumenta el riesgo de afectación ganglionar; de la misma manera, se ha demostrado el incremento del riesgo de metástasis hepática en situaciones de invasión venosa extramural (25).

- **Respuesta inflamatoria:**

El incremento de linfocitos T CD8+ intratumorales (5 o más linfocitos en al menos uno de diez campos de gran aumento) ha arrojado resultados favorables en cuanto a tiempo libre de enfermedad y supervivencia cáncer-específica se refiere en pacientes con CCR en estadio III (26). Esto se ha evidenciado en aquellos pacientes en los que se desarrollan agregados linfoides B foliculares (Reacción inflamatoria Crohn-like), cuya presencia guarda estrecha relación con casos de CCR en el Síndrome de Lynch (27).

- **Frente de invasión:**

Dos son los patrones de crecimiento del tumor. Un patrón disecante o infiltrativo de bordes imprecisos que se abre paso a través de los diferentes niveles del espesor parietal constituye un factor pronóstico negativo independiente, a diferencia de lo que ocurre cuando el frente de invasión sigue un crecimiento expansivo como en el que el tumor protruye sobre el tejido periférico (9) (28). Sin embargo, hoy en día no existe un claro consenso a la hora de evaluar y reproducir de manera robusta este parámetro (28).

#### **1.2.4 TRATAMIENTO**

En los CCR en estadio avanzado (III y IV) y en casos de afectación peritoneal la combinación de diferentes agentes quimioterápicos (5-fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino) ha demostrado un incremento en el tiempo libre de progresión de la enfermedad (no así en aquellos casos asociados a deficiencia de MMR, en los que

podría incluso tener un efecto adverso) (9). Asimismo, el tratamiento radioterápico pre o postoperatorio sobre el carcinoma rectal se ha asociado a un menor riesgo de recurrencia local incluso con resecciones en bloque rectales óptimas (29).

En los últimos años han ganado protagonismo las terapias dirigidas contra determinadas proteínas implicadas en vías de transmisión de señales oncogénicas; entre ellas, las dirigidas contra el receptor EGFR mediante anticuerpos monoclonales como cetuximab y bevacizumab. En ese sentido cobra especial significancia pronóstica la determinación de posibles mutaciones en las diferentes vías de señalización de EGFR (KRAS/NRAS-BRAF y, de manera emergente PI3K-PTEN-AKT) cuya presencia privaría a los pacientes afectados por CCR en estadio avanzado de beneficios en su aplicación (30).

### **1.2.5 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CCR**

- **Adenocarcinoma convencional (AdC):**

Es el tipo histológico representado en aproximadamente el 75-80% de los CCR. Suele presentar aspecto macroscópico variable según desarrolle un crecimiento exofítico o fungoide, endofítico o ulcerativo y anular o estenosante. La superficie de corte blanquecina se traduce en una imagen histológica de glándulas tortuosas y aberrantes, muy próximas unas de otras e incluso fusionadas que se rodean de un estroma fibroso desmoplásico. La celularidad epitelial proliferante que delimita dichas glándulas se caracteriza por presentar núcleos hipercromáticos agrandados que se distribuyen de manera pseudoestratificada con frecuentes figuras mitóticas. De la misma manera, es habitual que la célula pierda su capacidad mucosecretora, lo que se traduce en una notable disminución en la cuantía de vacuolas de mucosecreción apical. Es frecuente observar restos de secreción eosinófila y detritos celulares que conforman la llamada necrosis sucia.

- **Adenocarcinoma mucinoso (MuC):**

Aglutina a aproximadamente al 10% de todos los CCR. Con una superficie de corte gelatinosa, es el subtipo histológico que exige que más del 50% de la extensión tumoral esté constituida por lagos de mucina extracelular en cuyo espesor se encuentran inmersos acinos glandulares, fragmentos desflecados o células tumorales sueltas (con o sin diferenciación en anillo de sello). Es más frecuente en pacientes mujeres de edades más tempranas con afectación en hemicolon derecho y, tal y

como se ha mencionado anteriormente, guarda estrecha relación con alteraciones en el sistema de reparación de microsátélites.

- **Adenocarcinoma de células en anillo de sello (SrcC):**

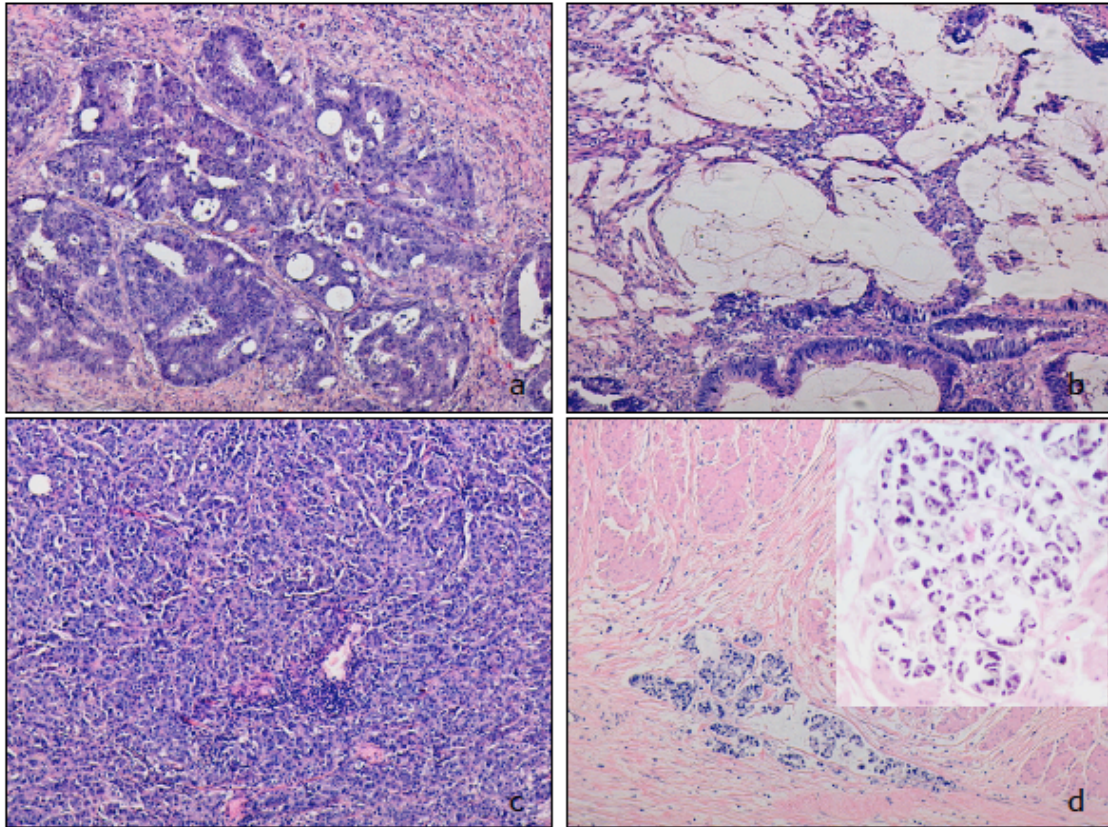
Variante adenocarcinomatosa que incluye células con amplio citoplasma repleto de mucina y núcleo excéntrico que abarcan más del 50% de la totalidad de la celularidad neoplásica representada. Estas células pueden localizarse inmersas en amplios lagos de moco o, menos frecuentemente, pueden seguir una distribución en sábana difusa con mínima mucina extracelular. Es por ello por lo que su aspecto macroscópico responde a un patrón de apariencia gelatinosa similar a la descrita en el MuC o a una imagen de linitis plástica. Constituye el 1% del total de CCR y con una incidencia ligeramente superior en hombres, se calcula que un tercio de los CCR desarrollados en un contexto de colitis ulcerosa son de este tipo.

- **Carcinoma medular:**

Tumoración epitelial de patrón organoide/trabecular compuesta por células epiteliales poligonales de cromatina vesiculosa, nucléolo prominente y amplio citoplasma eosinófilo entre los que se disponen abundantes linfocitos intraepiteliales. Guarda estrecha relación con defectos en el sistema MMR.

- **Carcinoma indiferenciado:**

Término restringido a aquellas tumoraciones de nidos sólidos y cordones de células de estirpe epitelial y pleomorfismo variable con nula o mínima (<5%) diferenciación glandular. Su alta densidad celular, escasa desmoplasia estromal y amplias áreas de necrosis son signos de este subtipo histológico que ha sido frecuentemente considerado la variante pobremente diferenciada del CCR. Son muy raros los casos englobados bajo este subtipo; no así los casos de AdC que, a lo largo de su extensión, incluyen pequeños focos de desdiferenciación (9) (11) (Figura 1.5).



**Figura 1.5. Imágenes microscópicas de subtipos histológicos de CCR.** a) (H&E 10x) Adenocarcinoma de tipo intestinal usual representado por estructuras cribiformes aberrantes embebidas en un estroma fibroplásico. b) (H&E 10x) La presencia de amplios lagos de material mucoide es característica del Adenocarcinoma mucinoso. De manera disgregada pueden apreciarse fragmentos glandulares residuales y tiras epiteliales neoplásicas disgregadas. c) (H&E 10x) El subtipo histológico indiferenciado suele estar constituido por trabeculaciones sólidas con mínimas o prácticamente inexistentes luces glandulares remanentes. d) (H&E 10x y H&E 40x) Regueros transmuros disecantes de células con amplio citoplasma y núcleo excéntrico son el componente principal en el Adenocarcinoma de células en anillo de sello (11).

### 1.3 MICROAMBIENTE TUMORAL:

La evolución de todo proceso tumoral en general y, del CCR en particular, es la que marca el curso terapéutico a seguir y, en casos que lo requieran, las medidas preventivas a tomar. Tradicionalmente el protagonismo a la hora de determinar la mayor o menor agresividad de la neoplasia ha recaído sobre la célula epitelial proliferante responsable de conformar el grueso de la masa tumoral en el CCR (31).

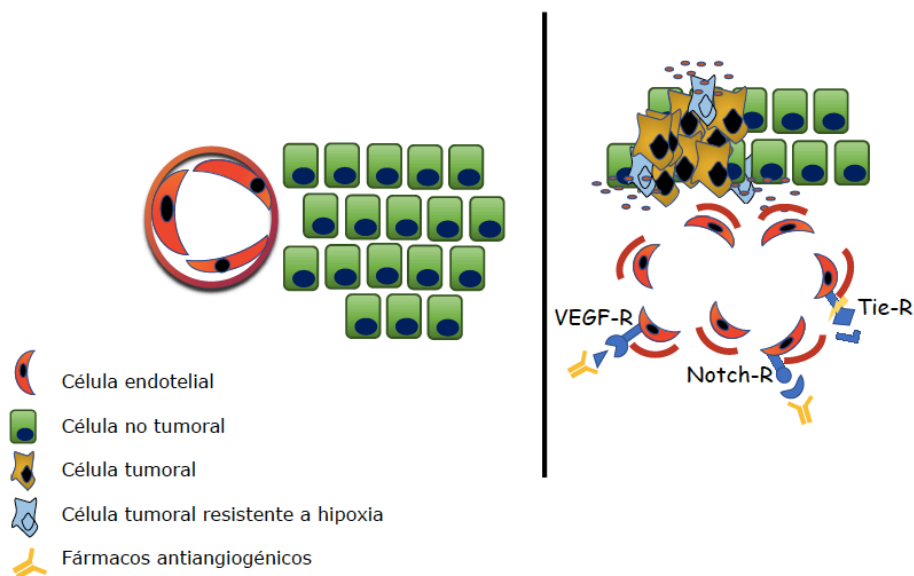
Que dos CCR del mismo subtipo histológico, grado y estadio puedan requerir de estrategias terapéuticas diferentes no es sorprendente hoy en día en la rutina asistencial diaria al igual que es histológica y biológicamente demostrable la diversidad de poblaciones celulares epiteliales que pueden formar parte de un mismo tumor (32) (33). Con intención de proporcionar tratamientos adecuados individualizados a todos y cada uno de los CCR diagnosticados, grandes esfuerzos se han realizado en definir las propiedades moleculares del CCR que han sido capaces de descifrar las múltiples vías oncogénicas activadoras y supresoras desencadenantes de la transformación maligna de la célula epitelial normal. Pese a todos esos avances y, si bien buena parte de las terapias farmacológicas están dirigidas a interferir en las vías de señalización oncogénicas antes descritas, salvo excepciones, éstas siguen mostrando una eficacia transitoria e incompleta (34). Y es que hoy en día se conoce que en la consecución de los ocho mecanismos distintivos que definen el desarrollo de todo proceso neoplásico (proliferación mitótica mantenida en el tiempo, evasión de sistemas supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inducción de la angiogénesis, inmortalidad replicativa, activación de la capacidad invasora y metastásica, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune) está también implicado el microambiente celular y extracelular que engloba al tumor (35). Ejemplo de ello es la publicación del Consenso de Subtipos Moleculares de CCR que contribuye no sólo a definir el perfil mutacional y vías carcinogénicas de la celularidad epitelial proliferante sino que recoge las evidencias científicas fundadas décadas antes e implica de forma consistente al microambiente tumoral en la patogenia, curso evolutivo y, por consiguiente, tratamiento del CCR (36) (37).

El microambiente tumoral está constituido por tres elementos fundamentales: células vasculares angiogénicas, células inflamatorias infiltrantes (IICs) y fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) (34). La interacción de estos tres elementos entre sí y la comunicación bidireccional con la célula tumoral son la base de un proceso educacional dinámico mediante el que las células del microambiente tumoral, genéticamente estables, son capaces de reorientar su habitual función neutral/antitumoral para adoptar un carácter protumoral esencial en el crecimiento y progresión de la neoplasia (38) (39). Esta plasticidad del entorno que rodea al tumor abre la puerta al desarrollo de nuevas terapias oncológicas basadas en reprogramar y modular la función del mismo (38).

### 1.3.1 CÉLULAS VASCULARES ANGIOGÉNICAS (AVCs)

Células endoteliales, pericitos y plaquetas en asociación con el Factor Vascular de la Célula Endotelial (VEGF) y otras vías de activación como Notch y Tie son las encargadas de satisfacer los requerimientos vasculares de todo proceso madurativo fisiológico y reparativo/regenerativo frente a una agresión (incluido un proceso tumoral) (40).

Bloqueantes de estas vías de señalización (Bevacizumab en el caso de VEGF y Notch y, Sorafenib y Sunitinib, en el caso de Tie) son terapias en uso que han demostrado obstaculizar la neovascularización y por tanto limitar el crecimiento de la masa tumoral (41). No obstante, se cree que el insuficiente aporte vascular de oxígeno y nutrientes para cubrir la demanda de una masa tumoral en continuo crecimiento es motivo por el que el tumor selecciona a algunas de sus células (menos sensibles a terapias antiangiogénicas) para que mediante la secreción del Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1), sean capaces de reactivar factores de transcripción angiogénicos involucrados en nuevos procesos de migración, invasión y neoangiogénesis. Así se constituirá una red desorganizada de vasos sanguíneos de pared fenestrada (34) (38) (41) (42), que facilitará establecer nuevas colonias tumorales a distancia (Figura 1.6).

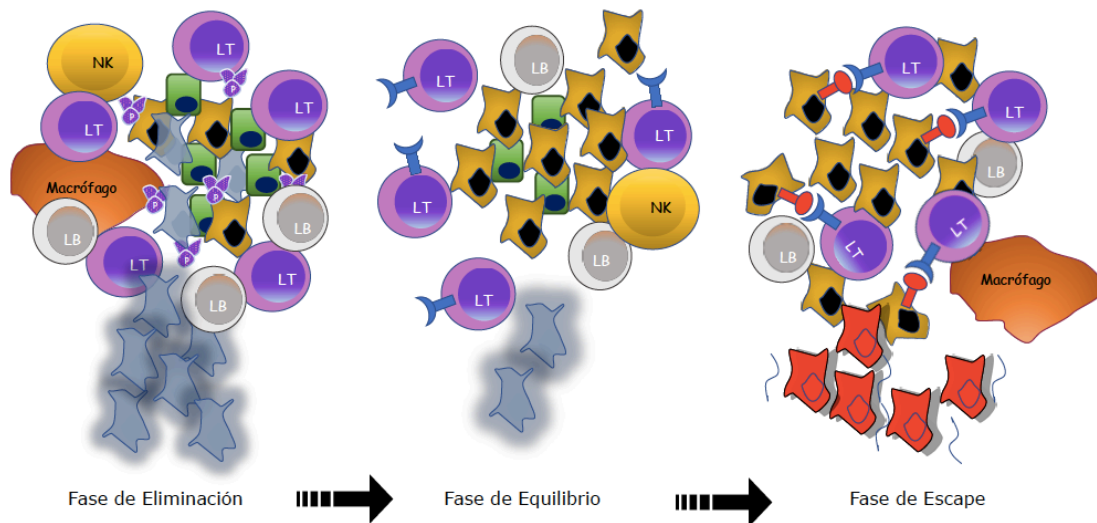


**Figura 1.6. Comparación entre vascularización fisiológica de tejido sano y neoproliferación angiogénica de tejido tumoral.** Células tumorales con mayor capacidad de resistencia a la hipoxia son capaces de inducir la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) que favorece la migración e invasión tumoral además de intensificar la angiogénesis. Todo ello, pese a que fármacos antiangiogénicos actúan previamente obstaculizando la formación de nuevos capilares sanguíneos (42).



### 1.3.2 CÉLULAS INFLAMATORIAS INFILTRANTES (IICs)

Frente a la tradicional y contrastada creencia de que el sistema inmune es una herramienta preventiva y supresora de la neoplasia, existen evidencias de que su interacción con la célula tumoral puede también potenciar el cáncer (42) (43). Tanto células tumorales como células estromales peritumorales propician la secreción de citocinas activadoras del sistema inmune innato inductoras a su vez de una respuesta adaptativa encargada de neutralizar y por tanto prevenir el desarrollo del tumor en el tejido humano (fase de eliminación). Sin embargo, con el paso del tiempo, estas mismas células tumorales y su microambiente serán responsables de modular negativamente dicha respuesta inmune ("immunoediting") que dará inicio a una larga etapa de latencia dinámica capaz de contener, pero no destruir al conjunto de células tumorales a las que un sistema exhausto de linfocitos T efectores es incapaz de hacer frente (fase de equilibrio). Finalmente, tras esta fase clínicamente silente, las células cancerosas serán capaces de suprimir los mecanismos efectores del sistema inmune para generar así un marco de autotolerancia en el que poder desarrollarse y proliferar como masa tumoral en su conjunto (fase de escape) (43) (44) (Figura 1.7).



**Figura 1.7. Ilustración del proceso de inmunomodulación tumoral.** Inicialmente el sistema inmune innato y adaptativo es capaz de neutralizar y destruir la celularidad tumoral emergente en la región (fase de eliminación). La continua recepción de estímulos tanto por medio de células presentadoras de antígeno como por medio de citocinas secretadas por las propias células tumorales es responsable de un estado prolongado de hiperactivación linfocitaria que a largo plazo desencadena el agotamiento de la capacidad de respuesta de dichas células T efectoras. Durante esta etapa, el sistema inmunitario apenas puede contener la proliferación tumoral (fase de equilibrio); prueba de dicho agotamiento es la expresión en la superficie de algunos LT del receptor PD-1, que en caso de interaccionar con su ligando (PD-L1) dará inicio a la respuesta negativa que inhabilite la actividad destructora del linfocito. Es precisamente en la fase de escape cuando la célula tumoral es capaz de interpretar esta situación exhausta del LT para expresar en su superficie PD-L1, dejando vía libre a poblaciones tumorales para constituir una masa tumoral a nivel local a la par que facilita su migración a distancia (43).

Atendiendo a los mecanismos de inmunosupresión descritos, son muchos los recursos volcados en desarrollar terapias encaminadas a atacar a los tumores tratando de interferir en estos puntos de regulación de tolerancia inmunitaria o Immune Checkpoints. Un ejemplo es el desarrollo de anticuerpos monoclonales como Ipilimumab (inhibidor del receptor CTLA-4) y Nivolumab y Pembrolizumab (Inhibidores del receptor PD-1), tratamientos aprobados y en uso para pacientes diagnosticados de melanoma y carcinoma pulmonar no microcítico en estadios avanzados (44) (45), cuya aplicación trata de hacerse extensible a otro tipo de neoplasias.

### **1.3.3 FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL CÁNCER (CAFs)**

- **Concepto de CAFs**

Los fibroblastos son células de linaje mesenquimatoso localizadas en el espesor del tejido conectivo estromal de los diferentes tejidos del organismo. Su habitual morfología fusiforme aplanada les permite ser reconocidos en su estado latente habitual inmersos en una matriz fibrilar conectiva extracelular de cuya elaboración son los principales responsables y que sirve de sustento a estructuras epiteliales, capilares y células inmunitarias (46).

Toda agresión con potencial suficiente para alterar la configuración habitual del parénquima de los diferentes órganos y sistemas, constituye la base de estimulación necesaria para que fibroblastos en estado quiescente sean reclutados para desempeñar las tareas de reconstrucción del medio extracelular. Precisamente, el tipo de estímulo recibido será el que ponga en evidencia la versatilidad y module la alta capacidad de resistencia a situaciones de estrés que tiene este tipo de célula. Por ejemplo, situaciones de daño agudo, tales como traumatismos mecánicos o lesiones inducidas por temperaturas extremas, entre otros, serán las que el fibroblasto utilice como vía de activación de su capacidad reparadora para que, una vez finalizado el proceso de cicatrización, pueda retornar a su estado basal latente a la espera de nuevas eventualidades. Por el contrario, procesos lesivos mantenidos en el tiempo, tales como trastornos metabólicos, autoinmunes y neoplasias requerirán un continuo proceso de reparación basado en la hiperactivación fibroblástica que, en el mejor de los casos dará lugar a una reacción fibrótica (conocida como fibrosis desmoplásica en el contexto neoplásico) en continua evolución, persista o no el estímulo desencadenante presente (47).

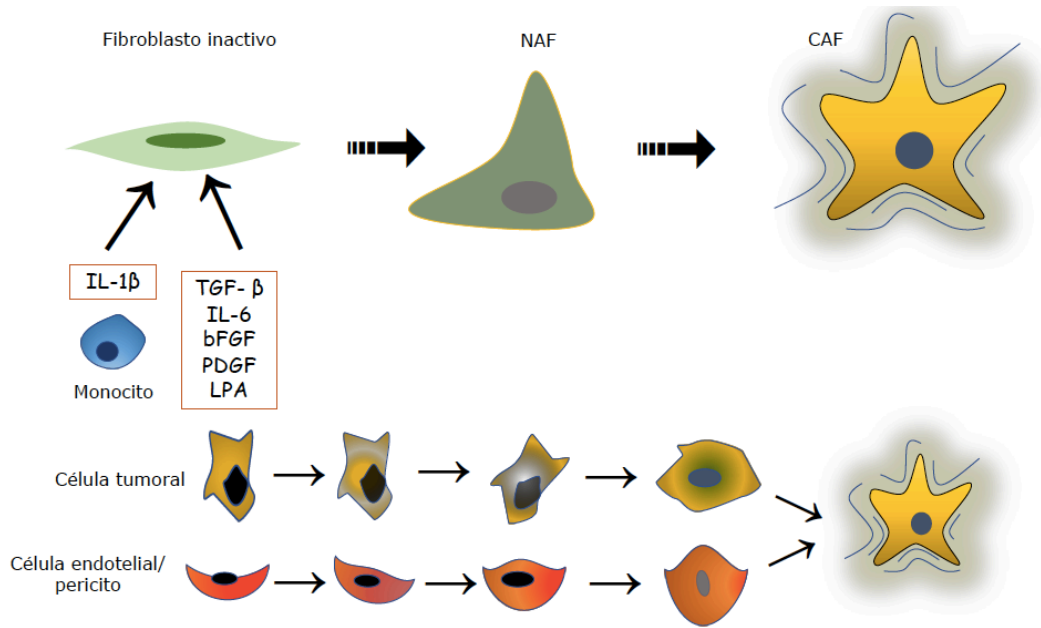
Al conjunto que integra a este heterogéneo grupo de fibroblastos encargados de remodelar la matriz extracelular y a su vez interaccionar con los restantes elementos del estroma y la tumoración en respuesta a un estímulo neoplásico se denomina Fibroblastos Asociados al Cáncer o CAFs (48).

- **Origen de CAFs**

El origen de los CAFs es muy diverso. La fuente inmediata que nutre a este conjunto reside en los fibroblastos quiescentes y células madre mesenquimales del tejido afectado. Fibrocitos procedentes de la médula ósea también son habitualmente reclutados. Sin embargo uno de los mecanismos más sorprendentes en los últimos tiempos es la capacidad de transdiferenciación que pericitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos e incluso las propias células epiteliales tumorales pueden llegar a sufrir a través de programas de transición endotelio/epitelio-mesénquima (a detallar posteriormente) para adoptar una serie de propiedades genéticas y fenotípicas que les lleva a actuar como CAFs (46) (48).

El reclutamiento y activación de fibroblastos es predominantemente consecuencia de la secreción de proteínas por parte de las células tumorales. Entre ellas la más estudiada es el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ). La unión a su receptor de tipo 2 (TGF $\beta$ -R2) en la superficie del fibroblasto induce el reclutamiento y fosforilación de TGF $\beta$ -R1, desencadenante a su vez de la liberación de sustancias de acción paracrina que facilitan la remodelación de la matriz extracelular. Otros factores implicados en los mecanismos de activación de CAFs son: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF), Interleucina 6 (IL6), derivados fosfolipídicos y proteínas y fragmentos de RNA neoplásico liberados a través de exosomas (46) (47) (48).

Al margen de los mediadores liberados por las células tumorales, hoy en día se conoce que la hipoxia generada en torno al tumor y las especies reactivas de oxígeno a través de la acumulación de HIF-1 $\alpha$  son estímulo de activación fibroblástica (46) (Figura 1.8).



**Figura 1.8. Activación de fibroblastos asociados al cáncer (CAFs).** La fuente principal de reclutamiento se sitúa en los fibroblastos del tejido sano que interactúan con las citocinas y factores de crecimiento secretados por las células tumorales y células del sistema inmune (monocitos y células dendríticas) vehiculizadas para tratar de contener el inicio de la proliferación tumoral. Estos fibroblastos activados asociados al tejido inicialmente sano (NAFs) no cesan en su tarea de reparación de la matriz extracelular debido a la continua estimulación recibida, lo que propicia su transformación irreversible en CAFs cuyo rol reparativo inicial adoptará un carácter protumoral que facilite no sólo el crecimiento e invasión local sino también la migración a distancia. Fuentes adicionales que enriquecen el medio tumoral de CAFs son los fibrocitos inmaduros procedentes de la médula ósea, células epiteliales tumorales y células endoteliales y pericitos que, en ocasiones, por la hipoxia que caracteriza al medio tumoral sufren procesos de dediferenciación y adopción de un fenotipo mesenquimatoso a través de los programas de transición endotelio/epitelio mesénquima (47).

- **Funciones de CAFs**

Las funciones que desarrollan los CAFs en el microambiente tumoral son muy variadas y a buena parte de ellas se les ha atribuido un carácter protumorigénico (48). Es cierto, que en etapas incipientes de la neoplasia y en el transcurso de la activación de los CAFs, son los fibroblastos activados asociados al tejido no neoplásico (NAFs) los primeros que van a acudir en respuesta a la llamada emitida por las células tumorales. Tiene sentido pensar, por lo tanto, que las primeras acciones reparativas a desarrollar por estos NAFs, van a estar encaminadas a acotar y suprimir el crecimiento tumoral a través de un mero proceso de cicatrización. No obstante, la culminación del proceso de reprogramación de estos NAFs en CAFs es lo que provocará el cambio de rol de estos últimos que se convertirán en sustento de la neoplasia a través de los siguientes mecanismos (47) (48):

- *Iniciación y progresión tumoral:*

La sobreexpresión del gen CXCL-12 en CAFs codificante de la citocina análoga y su interacción con el receptor CXCR-4 en las células neoplásicas (49), la secreción de Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF) y su influencia con el TGF $\beta$  (50) así como la potenciación de la vía oncogénica C-Met por parte del Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF) son parte del secretoma de los CAFs encargados de promover la invasividad del tumor (51).

- *Modificación del metabolismo tumoral:*

La vía glucolítica aeróbica puesta en marcha por los CAFs para catabolizar los sustratos tiene como consecuencia la liberación de lactato y cetonas que sirven de nutrientes al metabolismo oxidativo mitocondrial de las células neoplásicas (46).

- *Estimulación del fenotipo de células madre cancerosas o "cancer stem cell-like plasticity":*

Mediadores inflamatorios y citocinas secretadas por los CAFs (IL-6, PGE<sub>2</sub>, HGF,...) activan la vía de señalización Wnt/ $\beta$ Catenina en las células tumorales, lo que les permite no sólo exhibir propiedades de células madre sino asegurar su proliferación y mantenimiento en tumores como el CCR, predominantemente en el borde de infiltración tumoral (52) (53). Existen diferentes marcadores, pero a su vez con escasa organoespecificidad que pueden ser utilizados para identificar este nicho de células madre cancerosas (CSC) de cuya proliferación clonal va a depender la renovación y perpetuación del proceso neoplásico. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que dos de los marcadores más frecuentemente expresados en CSC del CCR son CD44 y CD133 (54). A día de hoy, la determinación de ambos marcadores por separado aporta resultados contradictorios en lo que a valor predictivo del curso de evolutivo de la neoplasia se refiere; ejemplo de ello es la disminución de expresión de CD44 en celularidad neoplásica metastatizada a ganglio linfático pericolónico (55) respecto al tumor primario, lo que da opción a interpretar que CD44 podría tener un papel más relevante en fases iniciales de la tumorigénesis y la disminución de su expresión ser indicativo de mayor riesgo de recurrencia y a la postre disminución del tiempo libre de enfermedad (54).

- *Modulación de la respuesta inmune:*

La liberación de factores pro y antiinflamatorios, citocinas y otros mediadores químicos por parte de los CAFs permite redireccionar la respuesta inmunitaria innata

y adaptativa hacia unas condiciones ambientales que favorecen la progresión tumoral. El reclutamiento de monocitos y su posterior diferenciación en macrófagos de tipo M2 propicia la progresión tumoral, reparación tisular, neoangiogénesis y liberación de factores inmunosupresivos (IL10, Arginasa, TGF $\beta$ ) inhibidores de la función citotóxica de los LT CD8 (38), de manera similar a como lo hacen los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y mastocitos asociados a tumor (56). La actividad de los Linfocitos NK, efectores citotóxicos principales en la respuesta innata, también puede verse atenuada debido a que TGF $\beta$  reduce los niveles de secreción de Interferón  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ), Granzima B y perforinas. Los efectos que la sobreexpresión de TGF $\beta$  tiene sobre el sistema inmune adaptativo tienen como diana fundamental a las células presentadoras de antígeno que ven disminuída la expresión en sus membranas de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 2 y moléculas coestimuladoras. A ello hay que sumar la posibilidad de que LT CD4 inmaduros puedan acumularse en áreas próximas al tumor para diferenciarse en un grupo particular de linfocitos T reguladores que promueven la tolerancia hacia las células tumorales a través de la inducción de TGF $\beta$  e IL10 (56).

Al margen de mecanismos directores como los descritos anteriormente, no se debe olvidar que la función de los CAFs que más llama la atención visualmente es la de la remodelación de la matriz extracelular. Precisamente la rigidez que aporta la disposición lineal engrosada de haces de colágeno en torno a vasos sanguíneos y tumor convierte a estos últimos en islotes de difícil acceso para la celularidad inmune cuyo posible efecto antitumoral resulta notablemente perjudicado (47) (56). Es por ello que cada vez es más frecuente encontrar menciones al aspecto microscópico de la matriz extracelular que sostiene al tumor, como pueden ser clasificaciones capaces de hacer distinción entre estromas colagénicos maduros, queloides o intermedios y mixoides. El acúmulo de proteínas como tenascina y fibronectina para renovar el medio extracelular tumoral sería el motivo por el que los estromas mixoides serían más habituales en tumores más agresivos con mayor número de ganglios linfáticos afectados, patrón de crecimiento infiltrativo e invasión venosa extramural (57).

- *Migración y metástasis tumoral:*

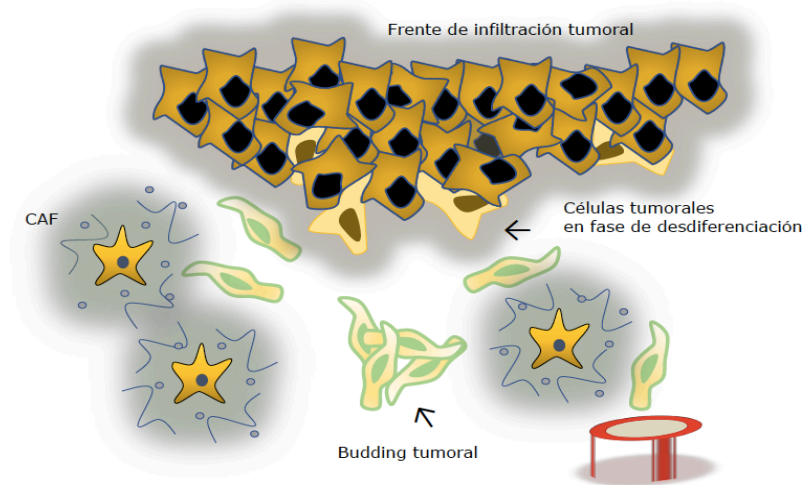
Para desprenderse del grueso de la masa tumoral, esquivar los mecanismos de vigilancia y destrucción inmune y alcanzar el torrente sanguíneo/linfático que le permita migrar hacia localizaciones distantes, la célula tumoral se sirve de la interacción recíproca con los CAFs para desarrollar lo que se conoce como el Programa de Transición Epitelio-Mesénquima o EMT (58). Este programa se

fundamenta en la activación de múltiples vías de señalización (TGF- $\beta$ /Wnt entre otras) que deriva en la expresión por parte de las células cancerosas de un perfil fenotípico mixto e incompleto (59) propio de células mesenquimatosas. Las células neoplásicas que sufren esta desdiferenciación se caracterizan por disminuir su expresión de E-cadherina, Claudina, Desmoplakina y Plakoglobina (moléculas por excelencia de adherencia entre células epiteliales) y, por el contrario, sobreexpresar factores de transcripción como  $\beta$ -Catenina, N-Cadherina, SLUG, SNAIL, Twist y  $\alpha$ -SMA (60) (61).

En el punto de partida de este viraje fenotípico podrían interferir otros factores como la sobreexpresión de ciclina. Este factor de transcripción proliferativo ejercería de llave fosforilativa de la vía PI3K/AKT, trasfondo molecular de la regulación negativa de E-cadherina (62).

La traducción al campo de la microscopía óptica de este complejo proceso que, en esencia, es una herramienta utilizada de manera fisiológica por el organismo durante la embriogénesis y también de forma patológica como mecanismo reparativo de cicatrización (58) (63), es la presencia de células de hábito fibroblástico que se desprenden de su habitual configuración epitelial polarizada y cohesiva para adoptar una morfología fibroblastoide con emisión de prolongaciones citoplasmáticas.

Tanto intra como peritumoralmente es habitual apreciar estas células de forma suelta o en pequeños agregados sólidos de cuatro o menos células que se disponen de manera independiente del componente glandular. Este hallazgo en los últimos años ha dado pie a acuñar el término histológico de *Budding* Tumoral. Valores altos de este parámetro están relacionados con un estadio TNM y grado histológico alto lo que implica mayor riesgo de permeación linfovascular y, en definitiva, diseminación a distancia (64) (Figura 1.9).



**Figura 1.9. Programa de transición epitelio-mesénquima (EMT).** Células tumorales del borde de infiltración se sirven de las señales enviadas por los CAFs para estimular la producción de factores de transcripción de linaje mesenquimal, disminuir la expresión de proteínas citoesqueléticas interepiteliales y por consiguiente modificar su aspecto microscópico que les aporta una configuración fusocelular propia de fibroblastos del microambiente. Es así cómo estas células tumorales lideran el frente de infiltración tumoral, ya sea de forma suelta o en pequeños grupos sólidos de menos de 5 células (*Budding* tumoral); favorecidas por una trama colagénica inmadura fabricada por los CAFs, consiguen esquivar el efecto citotóxico de las células inmunes y alcanzan el torrente sanguíneo para una vez asentadas en localizaciones distantes poder invertir este programa de dediferenciación (transición mesénquima-epitelio o MET) y desarrollar focos de crecimiento metastásico (58).

La relevancia cada vez mayor de los CAFs en la formación y sobretodo evolución de las neoplasias hace que sea muy atractivo poder identificarlos. Los marcadores que existen para ello son muchos y variados, sin embargo, poco específicos. Es por ello por lo que es un reto importante definir qué propiedades aportan a los CAFs estos marcadores en neoplasias de órganos y localizaciones diferentes. De una manera resumida, los marcadores de CAFs pueden clasificarse en los siguientes grupos (48) (65):

- Componentes de matriz extracelular: Colágeno I, Colágeno II, Fibronectina, Tenascina y enzimas remodelantes de la matriz extracelular (MEC) como por ejemplo LOX, MMP y TIMP.
- Factores de crecimiento y citocinas: TGF $\beta$ , VEGF, PDGF, EGF, FGF, WNT.
- Receptores y proteínas asociadas a membrana: PDGF-R, TGF $\beta$ -R, EGFR, FGFR, Podoplanina y FAP.
- Proteínas citoplasmáticas y componentes citoesqueléticos: Desmina, Vimentina,  $\alpha$ -SMA, FSP1 o S100A4.

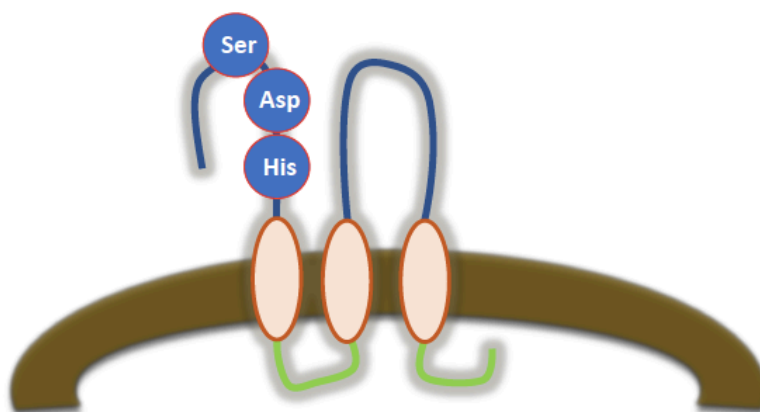


De entre todos ellos, el cada vez mayor conocimiento adquirido en las últimas dos décadas de la Proteína de Activación de Fibroblastos (FAP), los resultados prometedores proporcionados por algunos miembros de este grupo de trabajo (66) (67) en el ámbito del carcinoma renal y la cada mayor accesibilidad de medios técnicos en la rutina asistencial hospitalaria diaria nos animan a profundizar en el papel que pueda desempeñar FAP en el microambiente y, por consiguiente, en la biología tumoral del CCR.

## 1.4 PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS $\alpha$ (FAP)

### 1.4.1 CONCEPTO

La Proteína de Activación de Fibroblastos  $\alpha$  o FAP es una proteína con capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos o actividad proteasa cuyo centro catalítico efector enzimático incluye un residuo aminoacídico de serina. Por este motivo queda englobada dentro de la familia de serin proteasas o serin peptidasas (68). Codificada genéticamente en el cromosoma 2q23 (69) y compuesta por un total de 760 aminoácidos, atraviesa en varias ocasiones la membrana citoplasmática celular lo que le permite ser estructuralmente catalogada como proteína transmembrana tipo II (70) (Figura 1.10).



**Figura 1.10. Estructura de FAP.** Proteína transmembrana, en la que la mayor parte de los aminoácidos que la conforman integran un dominio hidrolítico (incluye la tríada catalítica de serina en conjunción a los residuos de aspartato e histidina) expuesto en la vertiente extracelular de la bicapa lipídica. Los 20 y 6 aminoácidos restantes integran el segmento transmembrana y porción citosólica, respectivamente (70).

La expresión de FAP en el organismo está prácticamente limitada a fibroblastos activos del estroma y células perisinusoidales hepáticas (células Ito o células hepáticas esteladas) en respuesta a procesos inflamatorios y cicatriciales y, en particular, a los CAFs en los que la proteína suele estar sobreexpresada hasta en un 90% de todas las neoplasias epiteliales malignas (70). Se admite que células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea en el adulto y, de manera transitoria, algunos tejidos mesenquimatosos fetales puedan expresar FAP (69). En los últimos tiempos hay quien afirma que incluso algunas células tumorales epiteliales podrían expresar esta proteína (71).

FAP cuenta también con una fracción soluble en plasma y, a diferencia de lo que ocurre con su expresión en tejido, los escasos estudios desarrollados hasta el momento apuntan a que su producción no depende totalmente de los CAFs (72) (73). Se cree que, de manera fisiológica, tejidos como el hepatobiliar e incluso el sistema inmune podrían ser fuentes de producción de dicha proteína (74).

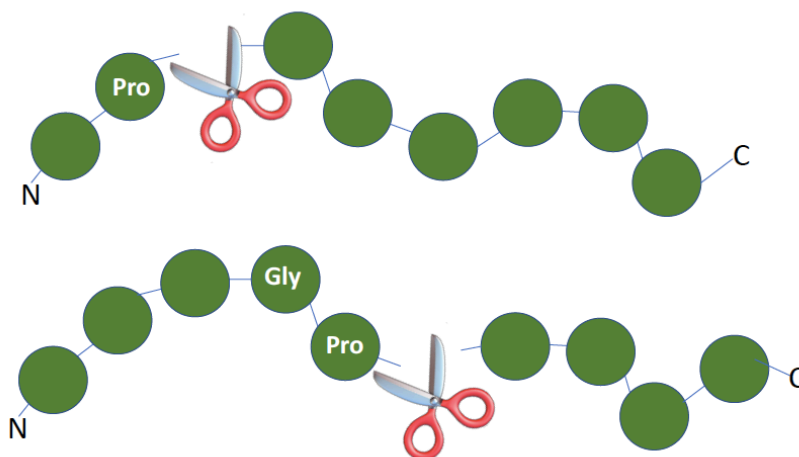
Cultivos celulares desarrollados en condiciones tumorales e inflamatorias han demostrado que factores de crecimiento partícipes de la activación de CAFs estimulan igualmente la expresión de FAP en los mismos, entre ellos, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e IL1 $\beta$ . No obstante, el factor de transcripción cuyo mecanismo de acción con más detalle se ha descrito es TGF $\beta$  producido por las propias células epiteliales tumorales y movilizado por diferentes elementos de la MEC (71) (75).

#### **1.4.2 FUNCIÓN**

La actividad de FAP puede ser de dos tipos.

- **Actividad Enzimática:**

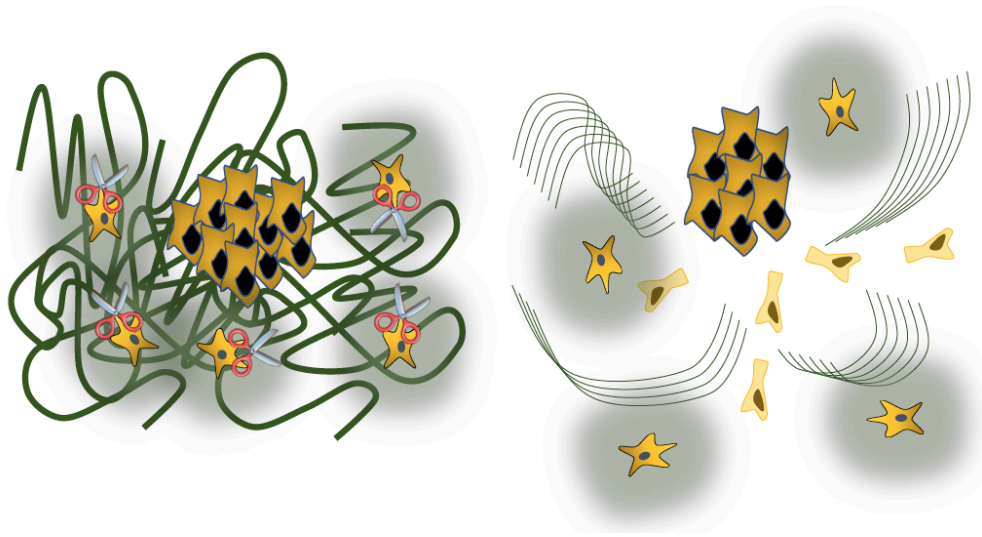
Tal y como su naturaleza de peptidasa indica, FAP es capaz de desarrollar una función de degradación proteica enzimática ya sea mediante actividad dipeptidil peptidasa (DPP), ya sea ejerciendo su capacidad de enzima endopeptidasa (70) (Figura 1.11).



**Figura 1.11. Actividad enzimática de FAP.** La dimerización de FAP permite desarrollar la función hidrolítica sobre un aminoácido de prolina, ya sea aplicando su actividad dipeptidil peptidasa en fragmentos de dos aminoácidos próximos a la región N-terminal o, recurriendo a su actividad endopeptidasa, en zonas alejadas más allá de dos aminoácidos desde la región N-terminal siempre y cuando el aminoácido de prolina esté precedido de un aminoácido de Glycina (70).

Hoy en día es conocido que la puesta en marcha de su actividad DPP le permite ejercer de llave reguladora de varios procesos de señalización. Por ejemplo, uno de los sustratos de FAP como es el Neuropeptido Y (NPY) adquiere un rol proangiogénico una vez catalizado (76).

Más interesante en lo que respecta al microambiente tumoral es la actividad endopeptidasa desarrollada por FAP. Y es que la posibilidad de escindir cadenas peptídicas a nivel de regiones aminoacídicas igualmente marcadas con prolina, aunque precedidas de glicina, en localizaciones distantes a los extremos peptídicos y por tanto en regiones proteicas centrales, posibilita que sustratos que abundan en el estroma peri e intratumoral, como son colágeno tipo I y gelatina, puedan ser hidrolizados (previa catalización por metaloproteinasas de tipo colagenasa y gelatinasa) en moléculas de menor tamaño. Es así como se cree que a la postre integrarán una matriz extracelular favorable a la migración tumoral (76) (77) (Figura 1.12). Aproximaciones a esta labor colagenasa de FAP han sido sustentadas en el trabajo de Fan y colaboradores en el que FAP parece ser partícipe de modular, atenuar e incluso revertir la fibrosis colagénica pulmonar secundaria a la instilación de agentes quimioterápicos en roedores (78).



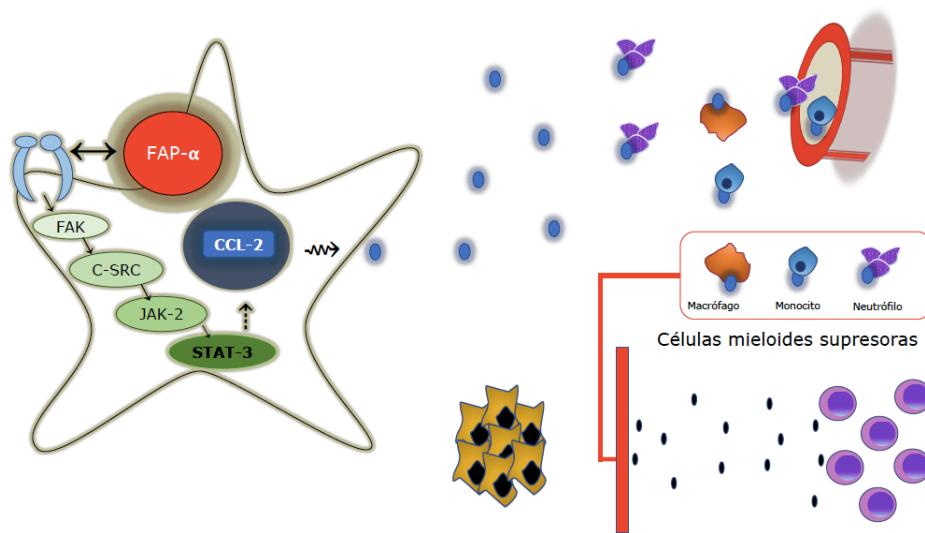
**Figura 1.12. Actividad enzimática de FAP en la matriz extracelular del microambiente tumoral.**

La actividad enzimática proteolítica de FAP permite al fibroblasto desenmarañar, pero no por ello dejar de producir una matriz extracelular repleta de haces de colágeno, fibronectina y ácido hialurónico trazada inicialmente para contener la expansión tumoral. Producto de ello es una matriz desmoplásica inmadura que promueve la migración de la célula tumoral a través de fibras colagénicas de menor longitud orientadas de forma paralela (69).

- **Actividad No Enzimática:**

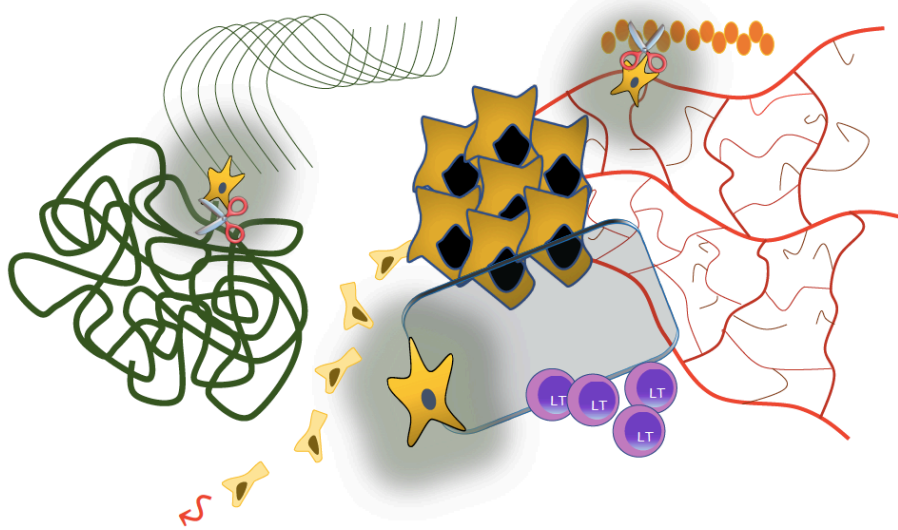
Recientemente existen trabajos que presentan a FAP como una proteína moduladora de diferentes vías de señalización celular no enzimática. A esta conclusión, todavía no del todo aclarada, se llega a partir de estudios en cáncer de mama en los que pese a la supresión de la actividad catalítica de FAP se observan signos de crecimiento y migración de las células tumorales a partir de la fosforilación de PI3K y AKT (79). Estas últimas aportaciones vienen a corroborar la sospecha ya existente años atrás de que FAP y las proteasas en general podrían servirse de herramientas no catalíticas para complementar su función (80). En este sentido grandes complejos proteicos entre FAP y otras proteínas transmembrana como las integrinas podrían iniciar la transducción de señales en cadena hacia el interior del citoplasma celular a través de la modulación de diferentes vías de señalización (75). Producto de ello es, por ejemplo, la estimulación de la Proteína Transductora de Señal-3 (STAT3) que activa en el núcleo celular de los fibroblastos la transcripción de la quimiocina CCL12 que promoverá, mediante la vehiculización sanguínea, el incremento de células mieloides supresoras en la MEC (81). Precisamente, se habla

de que estas células mieloides supresoras son las encargadas de excluir a los LT citotóxicos de las inmediaciones de la tumoración para así generar un medio de inmunosupresión favorable a la neoplasia (82) (Figura 1.13). La carencia de LT peri e intratumorales podría ser por tanto un argumento que daría sentido a la ineficacia de la inmunoterapia en algunos pacientes cuya inmunoexpresión tumoral positiva por ejemplo para PD-L1 hacía presagiar un futuro esperanzador (83).



**Figura 1.13. Ilustración de la modulación protumoral de FAP sobre el sistema inmunitario.** La activación de la vía JAK-STAT mediante la estimulación de FAP (complejo FAP-integrina) tiene como consecuencia la codificación y posterior liberación al estroma de CCL-2, quimioatrayente de células mieloides supresoras que bloquean la acción de IFN $\gamma$  secretado por las células T y dirigido contra la masa tumoral (81).

En este sentido es, precisamente, este rol modulador de la proteína el que invita a estudiar la acción de FAP no como un evento aislado e independiente sino como un conjunto de interacciones entre FAP y otras proteínas/factores de transcripción y genes directores de vías de señalización (84) (Figura 1.14).



**Figura 1.14. Ilustración de posibles mecanismos de FAP de acción conjunta protumoral.** La combinación de la actividad enzimática y señalizadora de FAP permite construir un medio extracelular favorable para el crecimiento y la migración tumoral. Una matriz colagénica ordenada, la rica trama vascular en constante edificación (consecuencia de la hidrólisis de Neuropeptido Y) y la inaccesibilidad de células inmunes citotóxicas al entorno son esenciales para que las células tumorales desdiferenciadas puedan abandonar su localización primaria de origen y anidar en zonas distantes (69) (76) (81).

### 1.4.3 EXPRESIÓN DE FAP EN NEOPLASIAS

La búsqueda de nuevas herramientas llamadas a complementar el ya amplio, pero siempre insuficiente arsenal terapéutico antitumoral ha sido y es, actualmente, motivo de estudio del papel que desarrolla FAP en las distintas neoplasias. Desde el descubrimiento de esta proteína a finales de los años ochenta (70) abundantes trabajos han permitido establecer las bases fisiológicas que, en el caso de algunos tumores como por ejemplo el carcinoma renal de célula clara (67) o el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (85), han tenido una traducción patológica sólida en cuanto a impacto pronóstico desfavorable se refiere. Sobre otros muchos procesos tumorales sólidos, existe una creencia bastante contrastada que igualmente apoya que la sobreexpresión de FAP puede ser responsable de un mayor riesgo de metástasis a distancia y por consiguiente de la disminución del tiempo libre de enfermedad y supervivencia cáncer-específica. No obstante, existe variabilidad de significación entre los resultados aportados por unos grupos de trabajo y otros; y el carcinoma colorrectal no es una excepción (86). En este sentido nuevos proyectos se han desarrollado en la última década destinados a homogeneizar muestras y criterios de evaluación de parámetros a estudio.

En el caso del carcinoma colorrectal las publicaciones referentes a FAP en la patogenia, proliferación y migración de la célula tumoral no son muchas, pero sí son reflejo del cada vez mayor conocimiento de la misma. Desde los primeros estudios de Iwasa y colaboradores en los que el fino patrón tintorial de la celularidad tumoral epitelial (además del estroma) en el borde de la masa proliferante dejaba entrever el papel de FAP en el programa EMT (87), hasta los trabajos más recientes de Wikberg y colaboradores en los que se incorpora el concepto de heterogeneidad intratumoral (88), el efecto protumorigénico de dicha proteína parece consolidado.

El estudio inmunohistoquímico de FAP, que es en esencia el método en el que basan sus conclusiones los trabajos anteriormente mencionados, ha permitido ubicar preferentemente su actividad en fases iniciales del carcinoma de colon, tal y como se deduce de la alta inmunorreactividad en el frente de invasión en tumores diagnosticados en estadio I (88) (89).

Además, las variables evaluadas para hallar una implicación de biomarcador oncológico asistencial de FAP han sido numerosas, y los resultados de supervivencia que se han ido aportando con el paso del tiempo no han sido menos. Entre otros, se menciona la relación entre mayor expresión de FAP y mayor riesgo de extensión ganglionar linfática locorregional (87) así como el pronóstico desfavorable de aquellos pacientes con intensa expresión intratumoral de FAP independientemente del estado de variables clinicopatológicas la inestabilidad de microsatélites (88).

Este tipo de conclusiones sugieren, por tanto, explorar vías integradoras en las que se determine con mayor precisión cuál es el papel de FAP en el CCR y además qué actores secundarios podrían interactuar con esta proteína en su objetivo global de promover un crecimiento local y, sobretodo, a distancia del tumor.

Uno de los aspectos de interés, hasta ahora inexplorado, es conocer la expresión de esta proteína de activación de CAFs en las propias metástasis locorregionales y a distancia. Analizar las diferencias respecto al tumor primario y su asociación con variables pronósticas podría arrojar información relevante sobre estas células y la expresión de FAP más allá de los estadios iniciales del CCR.

#### **1.4.4 LA FAP COMO POTENCIAL DIANA TERAPÉUTICA**

Existen en la actualidad diferentes herramientas terapéuticas capaces de interactuar con FAP, algunas ya testadas y de aplicación clínica común y, otras, en fase de experimentación. Atendiendo a su efecto final se pueden clasificar en fármacos bloqueadores de la actividad de FAP y fármacos destructores o citotóxicos de FAP (76).

La inhibición o bloqueo de la actividad enzimática tradicionalmente se ha considerado el arma más accesible para tratar de minimizar el efecto del microambiente tumoral en aquellas neoplasias sólidas con alto índice de expresión de FAP. Prueba de ello son el conjunto de ensayos clínicos puestos en marcha que desembocarían en la comercialización del agente Val-boroPro (Talabostat) hace unos años. Las bases teóricas en las que se fundamentaba su acción anti-DPP y anti-endopeptidasa hacían augurar unos resultados esperanzadores que no se correspondieron con la realidad. Y es que ensayos en fase II en pacientes con carcinoma colorrectal metastásico demostraron mínima actividad regresiva sobre la tumoración (90).

Dentro del segundo grupo se ubican las prodrogas que son agentes citotóxicos asociados a una secuencia peptídica específica reconocible por FAP. La hidrólisis de dicha secuencia peptídica desencadena la activación del agente citotóxico y la consecuente destrucción de la célula con expresión de FAP. Este tipo de terapias permite reducir considerablemente los efectos secundarios derivados del efecto citotóxico en la celularidad no neoplásica. Así se ha demostrado, por ejemplo, en la conjugación de doxorubicina y una secuencia potencialmente hidrolizable por FAP. En cualquier caso, la búsqueda de péptidos específicos de FAP debe continuar puesto que estas secuencias aminoácidas son reconocibles por otra serie de oligopeptidasas propias de tejidos no tumorales (76).

En la actualidad buena parte de la atención en la investigación de FAP recae sobre el tratamiento inmunoterápico que persigue potenciar el sistema inmune propio del individuo como mecanismo de destrucción de células estromales. De esta manera se pretende alcanzar una acción sinérgica entre los novedosos tratamientos inmunoterápicos ya existentes dirigidos contra la célula tumoral proliferante y los emergentes tratamientos inmunoterápicos dirigidos contra elementos del microambiente tumoral (91). Y es que se cree que complementar los tratamientos farmacológicos con acciones dirigidas contra células genéticamente más estables que las células epiteliales tumorales como son los CAFs puede resultar beneficioso. Prueba de ello es que la vacunación con plásmidos recombinantes de FAP en estudios experimentales en roedores ha conseguido detener el crecimiento tumoral mediante el incremento del número de LT CD8+ en el microambiente tumoral. Partiendo de esta base, se ha llevado a cabo ensayos en fases I y II que han utilizado anticuerpos monoclonales humanizados contra FAP en pacientes con CCR avanzado. Estos ensayos han demostrado mínima respuesta clínica asociada por lo que es necesario continuar con la búsqueda de anticuerpos anti-FAP  $\alpha$  más eficientes (91) (92).



## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es determinar la influencia de FAP como marcador oncogénico, evolutivo y pronóstico en el Carcinoma colorrectal.

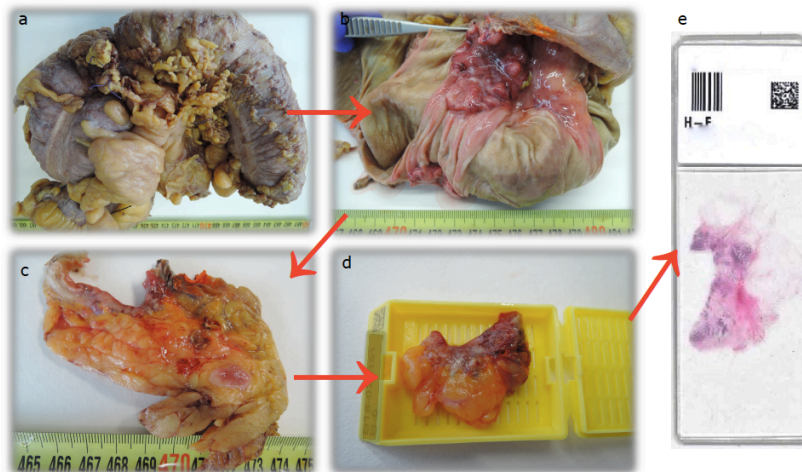
El desarrollo de este trabajo se ha sustentado en los siguientes pilares específicos:

1. Determinar la participación de FAP en la secuencia oncogénica adenoma-carcinoma.
2. Valorar la expresión de FAP en diferentes subtipos histológicos de CCR.
3. Definir la influencia de FAP en las diferentes etapas evolutivas del CCR avanzado, desde su localización primaria en la pared del intestino grueso hasta su extensión metastásica sistémica, de forma conjunta a variables clínico-patológicas de valor pronóstico reconocido.
4. Analizar el valor predictivo metastásico y de supervivencia de FAP en el CCR conjuntamente con otros marcadores de EMT ( $\beta$ -catenina), de fenotipo de células madre (CD44) y de proliferación celular (Ciclina-D1).
5. Estudiar el valor de la fracción soluble de FAP como biomarcador de CCR.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 SELECCIÓN DE CASOS

La muestra objeto de estudio está compuesta por pacientes diagnosticados de CCR e intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Universitario de Basurto (Bilbao) cuyas muestras histológicas embebidas en parafina y plasmas fueron recolectados y debidamente clasificados por el Biobanco Vasco de Tumores a la par que su procesamiento en el Servicio de Anatomía Patológica (Figura 3.1). La disponibilidad y manejo de estas muestras se ajustó a los requerimientos establecidos por el Departamento de Salud del Gobierno Vasco a través del Comité Ético de Investigación Clínica de Euskadi cuyo informe favorable fue aportado por medio de las resoluciones CEIC 11-51 y CEIC 16-108.



**Figura 3.1. Tallado macroscópico de pieza de CCR (Hemicolectomía derecha).** Tras la recepción de la pieza en fresco en el Servicio de Anatomía Patológica (a) se procede a su apertura (b) y fijación formólica durante 24 horas. Diferentes secciones transversales sobre la tumoración permiten identificar las áreas con mayor infiltración macroscópica (c) para su selección en cápsulas (d), posterior procesamiento y estudio microscópico final con la tinción de H&E (e).

Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron en lesiones primarias y metástasis locales y a distancia de una serie de 294 casos de CCR diagnosticados entre los años 1997 y 2012. Si bien todos los casos desarrollaron metástasis a distancia en algún momento de la enfermedad, el debut de la misma se produjo en diferentes estadios. En este sentido, se realizó análisis la evolución de la enfermedad neoplásica de manera retrospectiva desde el momento del diagnóstico quirúrgico hasta su fallecimiento debido a la misma. Se aportan parámetros clínico-patológicos en Tabla 3.1

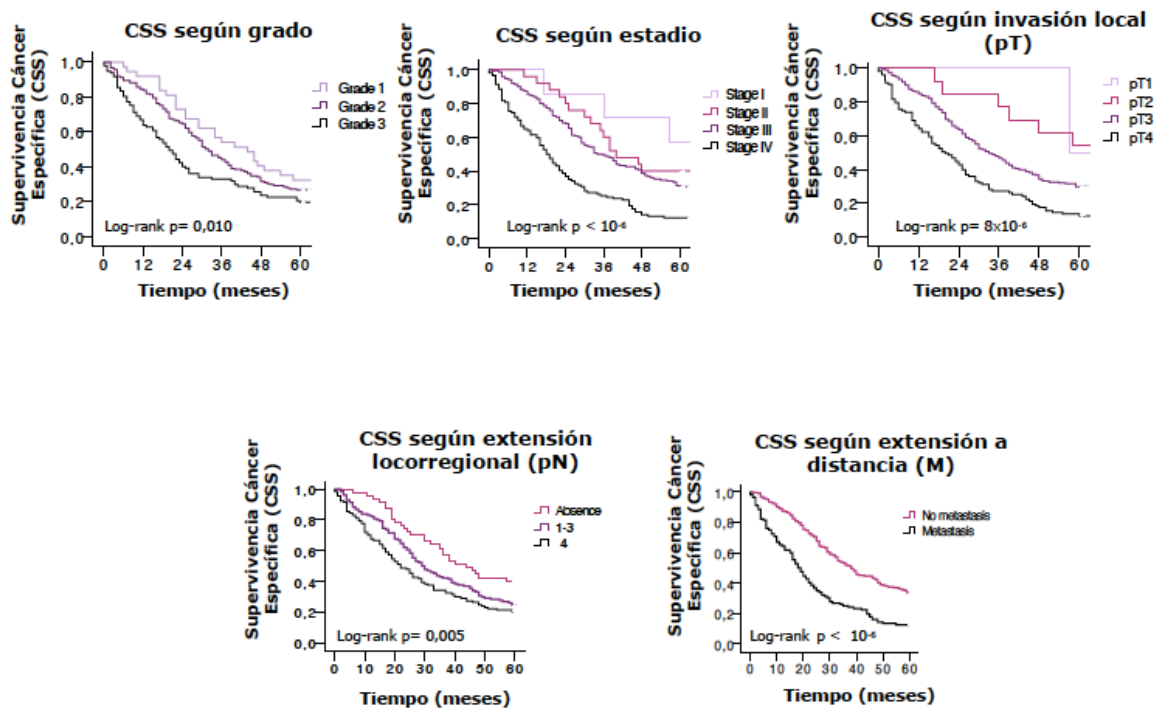
**Tabla 3.1. Parámetros clínico-patológicos de los pacientes con CCR avanzado seleccionados para los análisis inmunohistoquímicos.**

Parámetros clínico-patológicos n= 294		%
Tiempo de seguimiento (meses)		44 (0-188)
Media de Edad		70 (29-23)
Sexo	Hombre	203 (69%)
	Mujer	91 (31%)
Localización	Ciego	14 (5%)
	Colon Ascendente	43 (14%)
	Colon Transverso	14 (5%)
	Colon Descendente	20 (7%)
	Sigma	103 (35%)
	Recto	100 (34%)
Subtipo Histológico	Adenocarcinoma convencional	231 (79%)
	Adenocarcinoma mucinoso	50 (17%)
	Adenocarcinoma de células en anillo de sello	13 (4%)
Grado Histológico (G)	G1	37 (13%)
	G2	161 (55%)
	G3	95 (32%)
Invasión local (pT)	pT1	2 (1%)
	pT2	13 (4%)
	pT3	178 (61%)
	pT4	101 (34%)
Extensión locorregional (pN)	pN0	47 (16%)
	pN1	130 (44%)
	pN2	117 (40%)
Metástasis a distancia (M)	M0	182 (62%)
	M1	112 (38%)
Estadio	I	7 (2%)
	II	25 (9%)
	III	150 (51%)

3.Material y métodos

	IV	112 (38%)
Supervivencia Cáncer-Específica (CSS)	Supervivencia > 5 años	74 (25%)
	Fallecidos ≤ 5 años	220 (75%)
	Supervivencia > 10 años	21 (7%)
	Fallecidos ≤ 10 años	273 (93%)

Esta serie tiene un seguimiento de 15 años que ha sido fundamental para la obtención de muestra metastásica. La evolución del conjunto de casos desde su diagnóstico hasta el fallecimiento de todos ellos se representa en Figura 3.2.



**Figura 3.2. Curvas de Supervivencia Cáncer-Específica de la serie de estudio de CCR avanzado según test de Log-Rank.**

Sin embargo, no se disponía de muestras sanguíneas de los mismos pacientes. Por ello, para el análisis de la fracción soluble de la FAP se empleó una serie diferente de muestras plasmáticas de pacientes diagnosticados de CCR (subtipo histológico AdC) entre 2012 y 2014. Esta serie posibilitaría asimismo obtener tejido parafinado de pólipo adenomatoso y tumor infiltrante sincrónico en pieza quirúrgica en un total de 41 pacientes. Sus características se detallan en Tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Características clínico-patológicas de la serie para el análisis de la fracción soluble de la FAP.**

Parámetros clínico-patológicos (n=127)		(%)
Tiempo de seguimiento (meses)		50 (3-83)
Media de edad		70 (34-93)
Sexo	Hombre	92 (72%)
	Mujer	35 (28%)
Grado Histológico (G)	G1	6 (5%)
	G2	118 (93%)
	G3	3 (2%)
Invasión local (pT)	pT2	32 (25%)
	pT3	85 (67%)
	pT4	10 (8%)
Extensión locorregional (pN)	pN0	75 (59%)
	pN1	41 (32%)
	pN2	11 (9%)
Metástasis a distancia (M)	M0	123
	M1	4
Estadio	I	26 (20%)
	II	48 (38%)
	III	49 (39%)
	IV	4 (3%)
Invasión vascular venosa (V)	No	110 (87%)
	Sí	17 (13%)
Invasión vascular linfática (L)	No	103 (81%)
	Sí	24 (19%)
Invasión perineural (Pn)	No	108 (85%)
	Sí	19 (15%)

## 3.2 EXPRESIÓN PROTEICA

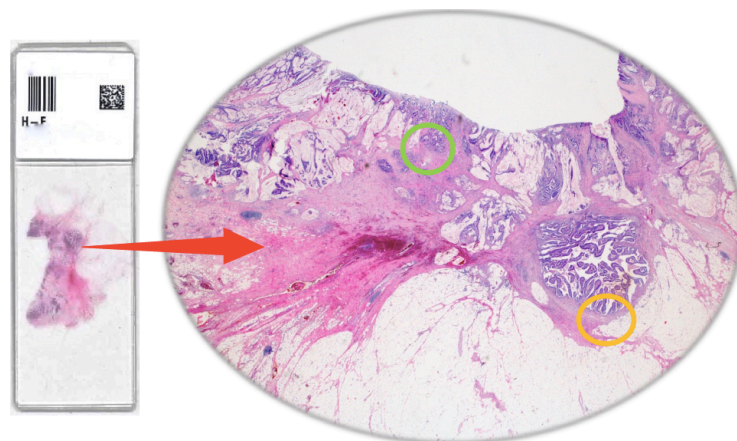
### 3.2.1 CONSTRUCCIÓN DE TMAs

Se denomina Micromatriz de Tejido o Tissue Microarray (TMA) a la matriz de parafina que aglutina múltiples muestras de uno o varios tejidos que permite aplicar, valorar y comparar diferentes técnicas histológicas de forma estandarizada y reproducible con un alto rendimiento coste-efectivo (93) (94).

Para el estudio de la secuencia adenoma-carcinoma, fueron seleccionadas áreas que incluían mucosa colorrectal no tumoral, pólipo adenomatoso y adenocarcinoma colorrectal a nivel del frente de invasión en su zona de máxima infiltración parietal. Esto fue posible en 42 casos.

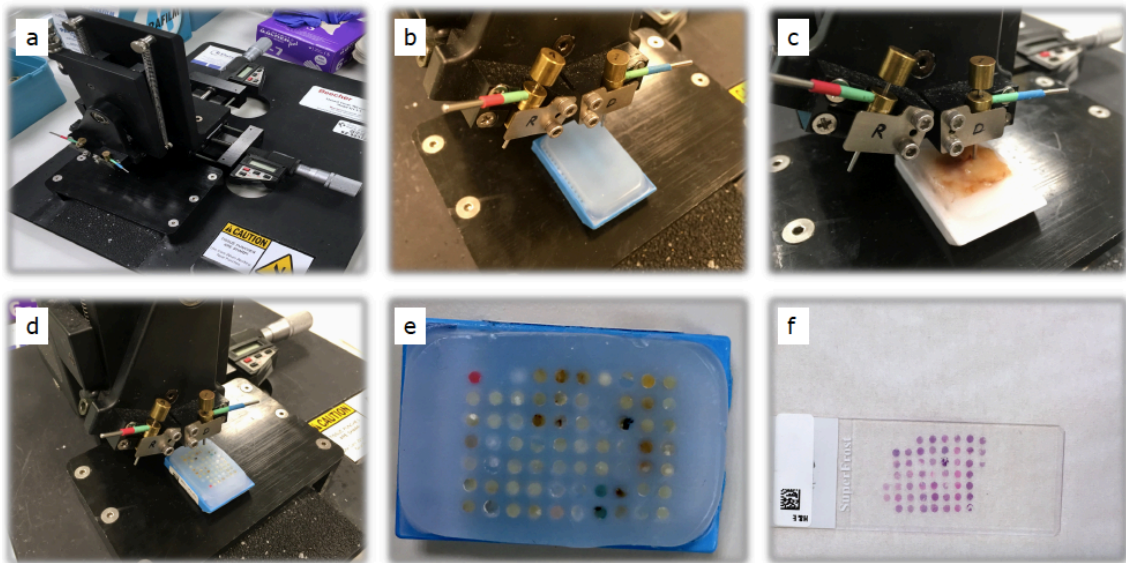
Para el análisis de infiltración local y extensión a distancia del CCR, el material correspondiente a zona central de la tumoración, borde de máxima invasión, metástasis en ganglio linfático locorregional y metástasis hepática fue seleccionado en las laminillas histológicas de Hematoxilina-Eosina (H&E) para su incorporación en los TMAs (Figura 3.3).

En ambos casos, a cada una de las regiones seleccionadas se asoció una réplica con intención de validar la correcta aplicación de las técnicas histológicas en toda la extensión de la muestra y valorar posibles situaciones de heterogeneidad intratumoral.



**Figura 3.3. Ilustración de la selección de áreas del tumor primario a incluir en los TMAs.** Tras analizar todas las laminillas representativas de tumor, se procedió a seleccionar la laminilla en la que se apreciaba mayor invasión parietal para delimitar, a nivel del frente de invasión, la zona de máxima profundidad tumoral (círculo amarillo). Asimismo, zonas centrales de la tumoración ricas en celularidad tumoral fueron delimitadas (círculo verde) para su inclusión en los TMA. En ambos casos se tuvo en cuenta que los fibroblastos del estroma estuvieran representados en una proporción equivalente al tumor.

La construcción de los TMAs se realizó con el sistema Tissue Microarrayer Model MTA1 que, permitió incorporar cilindros de 1.5 mm de diámetro del bloque donante en el bloque de parafina receptor previamente habilitado para ello. Finalizada la transferencia de material del bloque donante al bloque receptor y tras incubación a 56°C durante 30 minutos para la correcta homogeneización de la parafina y alineación de los "cores", se realizaron cortes de 5  $\mu$ m de espesor con el microtomo para su posterior tinción con H&E y diferentes marcadores inmunohistoquímicos (93) (Figura 3.4).



**Figura 3.4. Ilustración de la construcción de TMAs.** a) Sistema Tissue Microarrayer Model MTA1 del Biobanco Vasco de Tumores en su sede del Hospital de Basurto. b) Extracción de cilindro de material parafinado de bloque receptor que servirá para alojar el core extraído del bloque donante. c) Punción y corte sobre zona seleccionada del bloque donante. d) Incorporación del cilindro de tejido parafinado extraído del bloque donante en la coordenada concreta previamente establecida del bloque receptor. e) TMA finalizado después de homogenización y compactación de la parafina. f) Corte histológico de H&E obtenido a partir del TMA.



### 3.2.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

La técnica inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica histoquímica que se basa en la aplicación de principios inmunológicos de reconocimiento antígeno-anticuerpo como mecanismo de identificación de diferentes proteínas en células y tejidos (95).

- **Procedimiento de tinción IHQ:**

Tras la desparafinación y recuperación antigénica de los cortes histológicos se realizaron las diferentes tinciones IHQ con el sistema Autostainer Link 48 de la casa comercial DAKO de manera automatizada. Atendiendo a los requerimientos específicos de los anticuerpos utilizados, el sistema desarrolló los siguientes procedimientos: bloqueo de la peroxidasa endógena, incubación con el anticuerpo primario (e incubación con el anticuerpo secundario en los casos requeridos), incubación con el polímero de visualización, adición del sustrato DAB y tinción con hematoxilina.

Finalmente, tras deshidratación con etanol en concentraciones crecientes (50%/70%/100%) y fijación con xileno, a cada una de las laminillas se le colocó el cubreobjetos para su adecuada visualización con el microscopio (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3. Anticuerpos utilizados en la detección proteica mediante IHQ y sus condiciones de optimización protocolaria.**

Anticuerpo	Ref.	Casa comercial	Origen	Dilución	Tiempo de Incubación
Anti B-Catenin	760-4242	Ventana	Ratón	Ready to use	20 min
Anti CD44	790-4537	Ventana	Conejo	Ready to use	20 min
Anti cyclin-D1	sc-718	Santa Cruz	Conejo	Ready to use	ON
Anti E-cadherin	790-4497	Ventana	Ratón	Ready to use	20 min
Anti Vimentin	760-2512	Ventana	Ratón	Ready to use	20 min
Anti FAP $\alpha$	Ab53066	Abcam	Conejo	1:70	50 min

- **Valoración de las tinciones IHQ en los TMAs:**

Se realizó la lectura de los TMAs por duplicado y de manera independiente. Atendiendo a las referencias bibliográficas consultadas se optó por un método de análisis semicuantitativo en los casos de CD44 (54) (55) (96), Ciclina-D1 (97) y E-cadherina (98). La valoración de Vimentina (98),  $\beta$ -catenina (99) y FAP (86) (88) (89) siguió un sistema de valoración cualitativo. En aquellos casos en los que se observó heterogeneidad intratumoral y ante situaciones de variabilidad intraobservador se optó por computar a efectos estadísticos el scoring de mayor expresión registrado.

El estudio de FAP siguió un sistema de valoración cualitativo en base al cual aquellos casos que presentaban una expresión inferior al 10% fueron considerados negativos y el resto positivos (89). Para la valoración de  $\beta$ -Catenina se tuvo en consideración el patrón de marcaje citológico (99). En este sentido se estableció una distinción entre los casos de patrón de expresión de membrana citoplasmática/citoplasma y los casos de expresión nuclear. El estudio de CD44 analizó no sólo el grado de expresión de la celularidad epitelial proliferante sino también la expresión por parte de la celularidad estromal no inmunológica. Una valoración semicuantitativa posibilitó clasificar los diferentes casos según la cuantía de células e intensidad de tinción de las mismas en cuatro grupos (0, 1+, 2+, 3+) (96). Para el análisis estadístico estos cuatro niveles se agruparon en 0-1 (expresión baja) y 2-3 (expresión alta). A la hora de evaluar la expresión de Ciclina-D1 sobre la celularidad tumoral se tuvo en cuenta tanto la intensidad de la tinción como el número de células tumorales que expresaban dicho marcador en el núcleo celular. De esta manera se realizó una estratificación inicial en cuatro niveles (negativo, débil, moderado e intenso) que finalmente permitió diferenciar unos casos con una expresión negativa/débil que quedaría englobada dentro del término expresión baja y otros con una expresión moderada/intensa que conformarían el grupo de expresión alta (97). Este registro de los criterios de valoración IHQ específico para cada uno de los marcadores se resume en Tabla 3.4.

**Tabla 3.4. Criterios de valoración IHQ de los diferentes marcadores utilizados.**

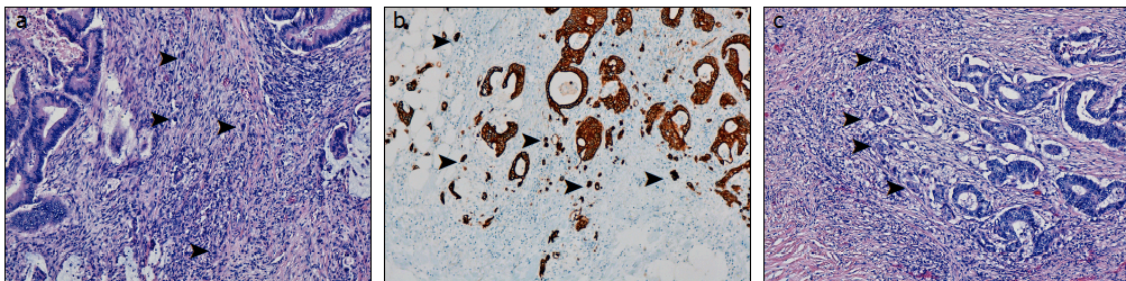
<b>Proteína</b>	<b>Célula expresada</b>	<b>Patrón de tinción</b>	<b>Scoring</b>	<b>Scoring agrupado</b>
CD44	Tumoral	Membrana	0	0-1 (bajo)
			1+ (Débil)	
			2+ (Moderado)	2-3 (alto)
			3+ (Intenso)	
Cyclin-D1	Tumoral	Nuclear	0 (Negativo)	0-1 (bajo)
			1+ (Débil)	
			2+ (Moderado)	2-3 (alto)
			3+ (Intenso)	
E-cadherin	Tumoral	Membrana	0 (0%)	
			1+ (<60%)	
			2+ (60-100%)	
Vimentin	Tumoral	Membrana/ citoplasma	Negativo (<40%)	
			Positivo (≥40%)	
B-catenin	Tumoral	Membrana/ citoplasma/ núcleo	Negativo	Negativo + Membrana/citoplasma Nuclear
			Membrana± Citoplasmático	
			Nuclear	
FAP α	Estromal	Membrana/ citoplasma	0 (<1%)	0-1 (Negativo)
			1+ (1-10%)	
			2+ (11-50%)	2-3 (Positivo)
			3+ (>50%)	

### 3.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL PROGRAMA EMT

Un subgrupo de 60 casos de AdC de la serie de CCR con largo seguimiento fue seleccionado de manera homogénea acorde al estadio tumoral con intención de evaluar el programa EMT en la rutina histológica de H&E.

Para ello se realizó un estudio conjunto de los denominados Agregados Celulares Pobrementemente Diferenciados o Poorly Differentiated Clusters (PDCs) y las características del estroma colagénico peritumoral, respuesta desmoplásica o Desmoplastic Reaction (DR).

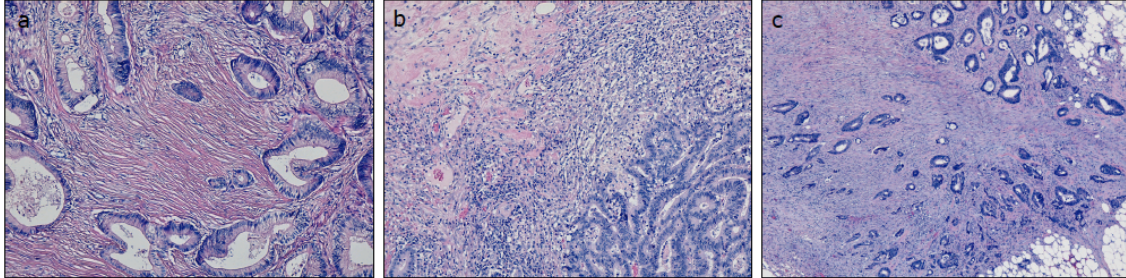
Se denomina PDC al nido sólido pobremente diferenciado conformado por  $\geq 5$  células no dependientes de la masa tumoral principal y sin configuración arquitectural glandular dispuesto en el frente de infiltración tumoral (100) (101). Se trata de un concepto recientemente acuñado que tiene como objetivo realizar una gradación análoga al *Budding* Tumoral de manera sencilla en la rutina de H&E con la consecuente mayor reproducibilidad interobservador. Tras analizar todos los cortes histológicos representativos de la tumoración y seleccionar aquél con mayor cuantía de PDC, se realizó un conteo en el campo con mayor densidad de dichos agregados utilizando el objetivo de 20x (Figura 3.5).



**Figura 3.5. Imagen histológica de Budding tumoral y comparación con PDC.** a) (H&E 10x) Las células (►) que, en pleno programa de EMT constituyen el *Budding* tumoral, están embebidas en un ambiente fibroso desmoplásico con denso infiltrado inflamatorio acompañante. Dicho ambiente estromal y la tendencia a adoptar una morfología fusiforme de hábito fibroblástico dificultan sobremanera la cuantificación de estas células. b) (CKAE1/AE3 10x) En muchas ocasiones se requiere del estudio de técnicas de inmunohistoquímica complementarias que resalten su correcta identificación. c) (H&E 10x) Con intención de favorecer un análisis coste-efectivo y con mayor reproducibilidad intersobservador, cada vez más frecuentemente existe la tendencia a cuantificar PDC (►), cuya concordancia análoga al estudio de *Budding* Tumoral y valor predictivo pronóstico han sido aceptados (102).

La respuesta colagénica a la agresión tumoral fue catalogada como madura, intermedia o inmadura en base a que el estroma perilesional mostrara haces de colágeno hojaldrado, reacción queloide o aspecto mixoide, respectivamente. En

aquellos tumores en los que se diferenciaban dos o más tipos de estroma se optó por registrar a efectos de clasificación el tipo de estroma de mayor grado de inmadurez (31) (Figura 3.6).



**Figura 3.6. Imagen histológica de los diferentes tipos de estroma peritumoral descritos:** Maduro u hojaldrado (a-H&E 10x), queuloide (b-H&E 10x) y mixoide (c-H&E 10x) (31).

De la combinación de ambos parámetros (PDC y DR) se elaboró un sistema de categorización en tres niveles tal y como se detalla en Tabla 3.5 (31).

**Tabla 3.5. Sistema de categorización de PDC y DR y la gradación resultante de la combinación de ambos.**

PDC	Scoring	DR	Scoring	Scoring agrupado	
<5	G1	Hojaldrado	Maduro	G1 + Maduro	Categoría A
				G1 + Intermedio	
				G1 + Inmaduro	
				G2 + Maduro	
5-9	G2	Queuloide	Intermedio	G2 + Intermedio	Categoría B
				G2 + Inmaduro	
				G3 + Maduro	
				G3 + Intermedio	
≥10	G3	Mixoide	Inmaduro	G3 + Inmaduro	Categoría C

### 3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FAPs EN PLASMA

El método de estudio ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) es una técnica que permite cuantificar la presencia de un determinado antígeno en medio líquido. Para ello se inmoviliza el antígeno a estudio en pocillos de placas de microtitulación a las que se añade un anticuerpo enlazado a una enzima. La unión del anticuerpo al antígeno activa la enzima, que a su vez es capaz de generar un producto detectable, en este caso, mediante espectrofotometría (103).

Para la determinación de los niveles de FAPs en plasma se utilizó el kit de ensayo para FAPs 27782; IBL. Se incorporaron a 96 pocillos 100 uL de reactivos, incuyendo muestras de plasma en una dilución 1/100. La incubación de los mismos se prolongó toda la noche a 4°C. Tras el lavado posterior se añadieron 100 uL de anticuerpo anti para su inmediata incubación a 4°C durante 1 hora. Tras el lavado final y la adición del cromógeno se midió la absorbancia a 450nm.

### 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa SPSS 24.0.

Los datos obtenidos de los análisis en el tejido y en el plasma de los pacientes con CCR fueron primero analizados con el test de Kolmogorov-Smirnov para conocer si seguían o no una distribución normal. En base a esta información, los posteriores análisis fueron realizados mediante tests paramétricos o no paramétricos.

Para evaluar la correlación existente entre la edad y sexo de los pacientes se utilizaron tests de Pearson y Spearman Rho. El test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) se empleó para el análisis cualitativo de la expresión de FAP en la secuencia pólipo-cáncer, y en el CCR en función de variables patológicas.

Para el análisis de supervivencia se emplearon curvas de Kaplan-Meier y tests Log-rank. Los grupos para este análisis se crearon en base a puntos de corte obtenidos mediante diferentes métodos. Para el análisis de los niveles de FAP en el plasma se utilizaron Árboles de Decisión, en concreto el método CRT (*Classification and Regression tree*). Para los análisis en el tejido, los puntos de corte se basaron en la expresión categórica de FAP (negativo frente a positivo) cuando esta se analizó de forma individual. Para el análisis combinado con  $\beta$ -catenina, CD44 o Ciclina D1, se crearon los grupos de este modo: 1) FAP positivo y beta-catenina nuclear frente al resto de combinaciones posibles entre estos dos marcadores, 2) FAP positivo y CD44

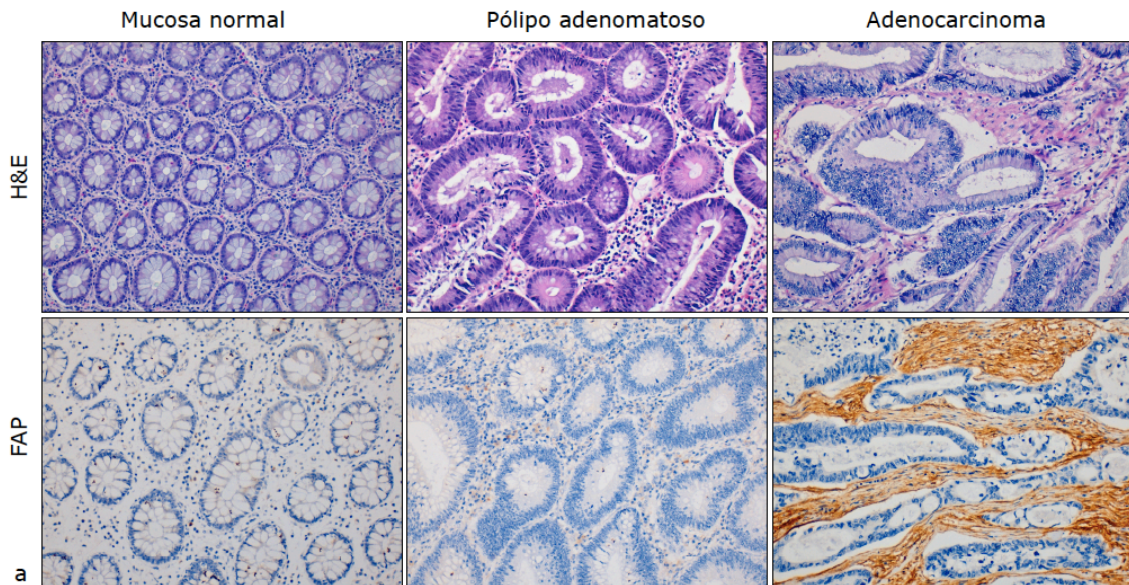
alta frente al resto, y 3) FAP positivo y Ciclina D1 alta frente al resto.

Por último, se emplearon análisis multivariantes para conocer si la FAP o alguna de las combinaciones de FAP con otros marcadores es un factor pronóstico independiente para la supervivencia (mediante Regresión de Cox) o para la aparición de metástasis a distancia (mediante Regresión Logística con paso final de Wald hacia atrás

## 4. RESULTADOS

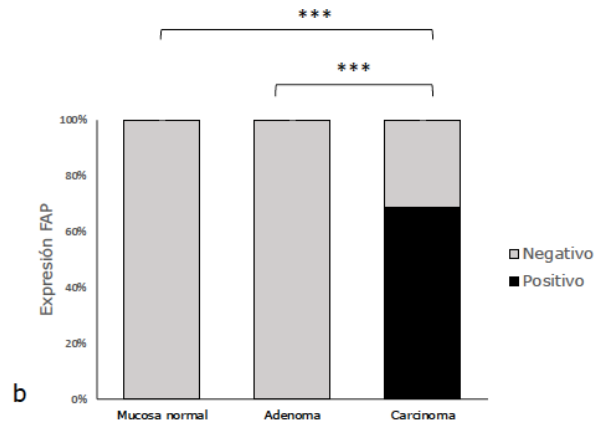
### 4.1 EXPRESIÓN DE FAP EN LA SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA

La expresión de FAP quedó limitada en su totalidad a los fibroblastos del estroma del CCR y la tinción admitida como válida fue aquella que combinaba un patrón citoplásmico y de membrana. El 68,3% de los casos de CCR analizados fue clasificado como FAP+, lo que contrastaba con los resultados obtenidos tras la tinción de secciones de mucosa de intestino grueso no tumoral y pólipo adenomatoso, que no mostraron inmunexpresión alguna ( $p < 0,001$ ) (Figura 4.1).





#### 4.Resultados



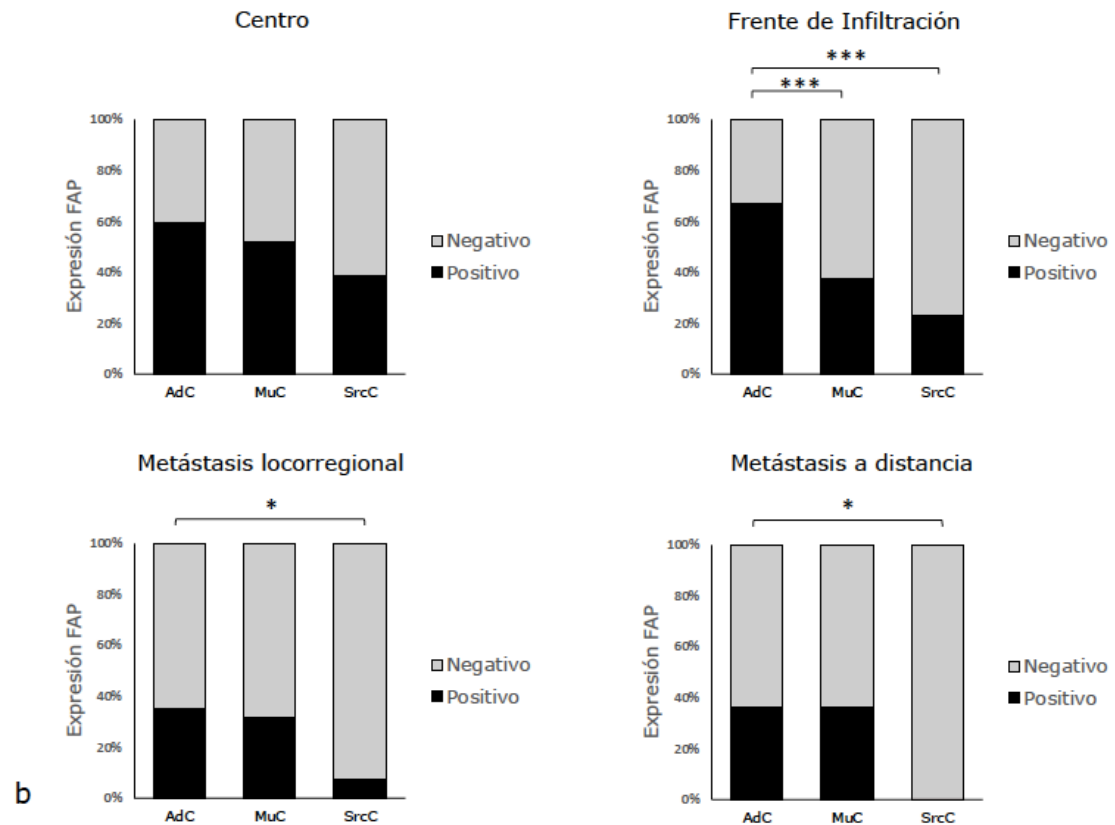
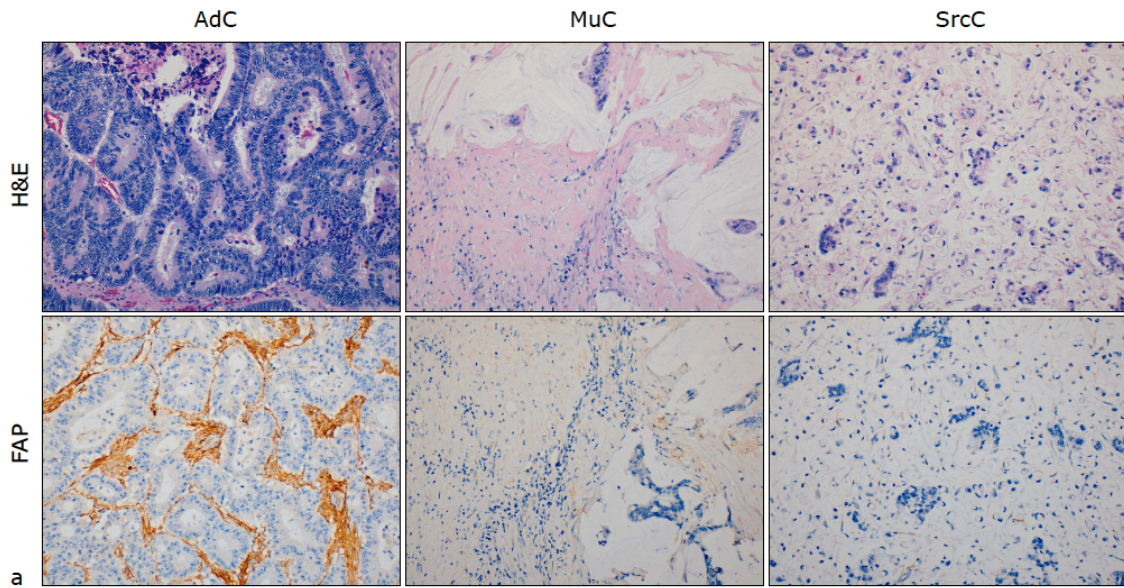
**Figura 4.1 Expresión inmunohistoquímica de FAP a lo largo de la secuencia adenoma-carcinoma.** a) (H&E 20x) Secciones histológicas representativas de mucosa de intestino grueso no tumoral, pólipo adenomatoso y CCR. b) Representación gráfica que ilustra que el 68,3% de los CCRs mostraron expresión positiva de FAP frente al 0% de casos de mucosa no neoplásica y pólipo adenomatoso. El test de Chi-Cuadrado arrojó resultados estadísticamente significativos ( $***p<0,001$ ) tanto en la secuencia en su conjunto como al analizar por separado las variables mucosas normal y adenoma respecto a CCR.

#### 4.2. EXPRESIÓN DE FAP EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CCR

El estudio de la expresión de FAP en los subtipos histológicos de CCR se realizó en las diferentes estaciones evolutivas de la enfermedad; desde su epicentro y frente de invasión en el intestino grueso hasta su diseminación a distancia, pasando por la interfase transitoria de metástasis locorregional en ganglio linfático perintestinal. Atendiendo al grueso de casos de CCR de nuestra serie, tres fueron los subtipos histológicos sujetos al análisis estadístico: Adenocarcinoma usual (AdC), Adenocarcinoma mucinoso (MuC) y Adenocarcinoma de células en anillo de sello (SrcC).

En el tumor primario, a nivel de centro de tumor, el 59,9% de los AdC, el 52,1% de los MuC y el 38,5% de los SrcC arrojaron resultados positivos en los fibroblastos de la región intratumoral ( $p>0,05$ ). Estos resultados contrastaban con los observados en el frente de invasión, ya que el 67% de los AdC fueron positivos respecto al 37,5% y 32,1% de los MuC y SrcC, respectivamente ( $p<0,001$ ).

A nivel de metástasis en ganglio linfático locorregional y metástasis hepática a distancia, llama la atención las diferencias entre AdC y MuC, donde más de un tercio fueron positivas para FAP, mientras en los SrcC las metástasis prácticamente dejaron de expresar esta proteína ( $p<0,05$ ) (Figura 4.2).



**Figura 4.2 Expresión inmunohistoquímica de FAP en los subtipos histológicos AdC, MuC y SrcC en las localizaciones de centro de tumor, borde de infiltración, metástasis en ganglio linfático locorreional y metástasis hepática a distancia.** a) (H&E 20x) Secciones histológicas representativas de mucosa de AdC, MuC y SrcC en borde de infiltración tumoral. b) Representación gráfica que ilustra la distribución de casos FAP+ y FAP - atendiendo a los tres subtipos histológicos más representativos de la serie según el test de Chi-Cuadrado (\* $p < 0,05$ ).

Debido a las diferencias histológicas existentes entre los tres subtipos y a las diferencias estadísticas observadas en la expresión de FAP, el resto de resultados que se presentan se corresponden a los observados en el AdC, que es el subtipo histológico más frecuente (casi el 80% en nuestra serie).

### **4.3 EXPRESIÓN DE FAP EN LA SECUENCIA TUMOR PRIMARIO-METÁSTASIS Y SU ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE CCR.**

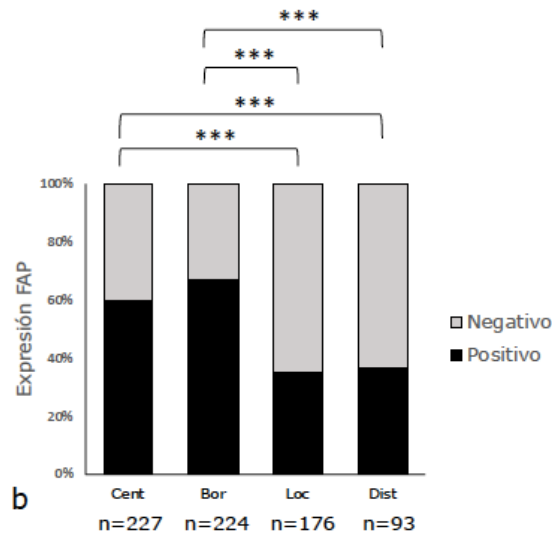
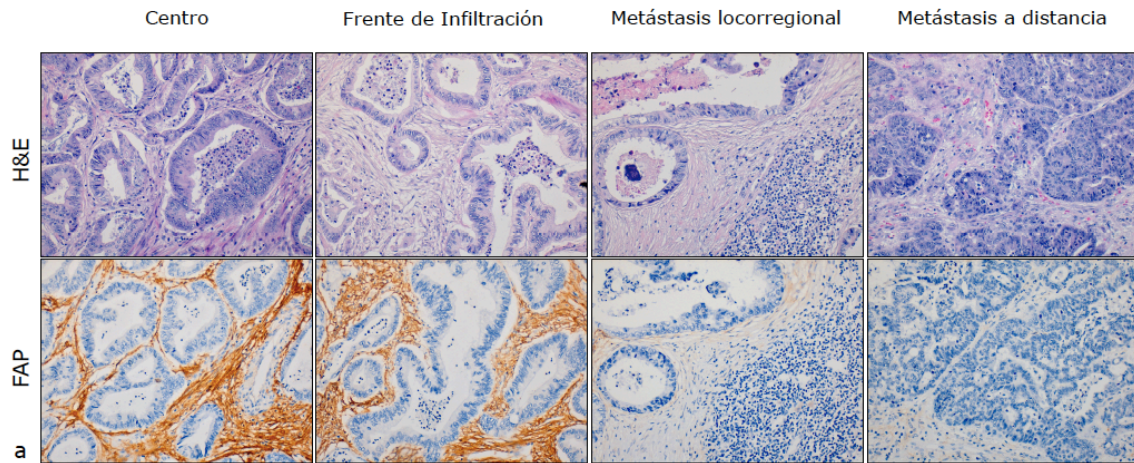
Con el objetivo de evitar posibles sesgos por edad o sexo de los pacientes, hicimos análisis de correlación entre ambas variables y expresión de FAP en los tumores. No se observó ninguna correlación significativa (Spearman Rho,  $p > 0.05$  en ambos casos).

#### **4.3.1 Análisis de FAP en la secuencia tumor primario-metástasis.**

Tanto el centro de la tumoración primaria como su frente de infiltración mostraron resultados similares de expresión de FAP en el AdC. Con una inmunoexpresión del 59,9% en el centro y 67% en el borde, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 4.3).

Tampoco se observaron diferencias significativas entre las metástasis locorregionales (35,2%) y las metástasis a distancia (36,6%).

Sin embargo, el salto cuantitativo importante se identificó entre la expresión de FAP a nivel del tumor primario y el tejido metastásico, ya fuera locorregional o a distancia. La significación estadística ( $p < 0,001$ ) manifestada por separado de centro y borde de tumor primario para con sus metástasis en ganglio linfático e hígado, así lo demuestra (Figura 4.3).

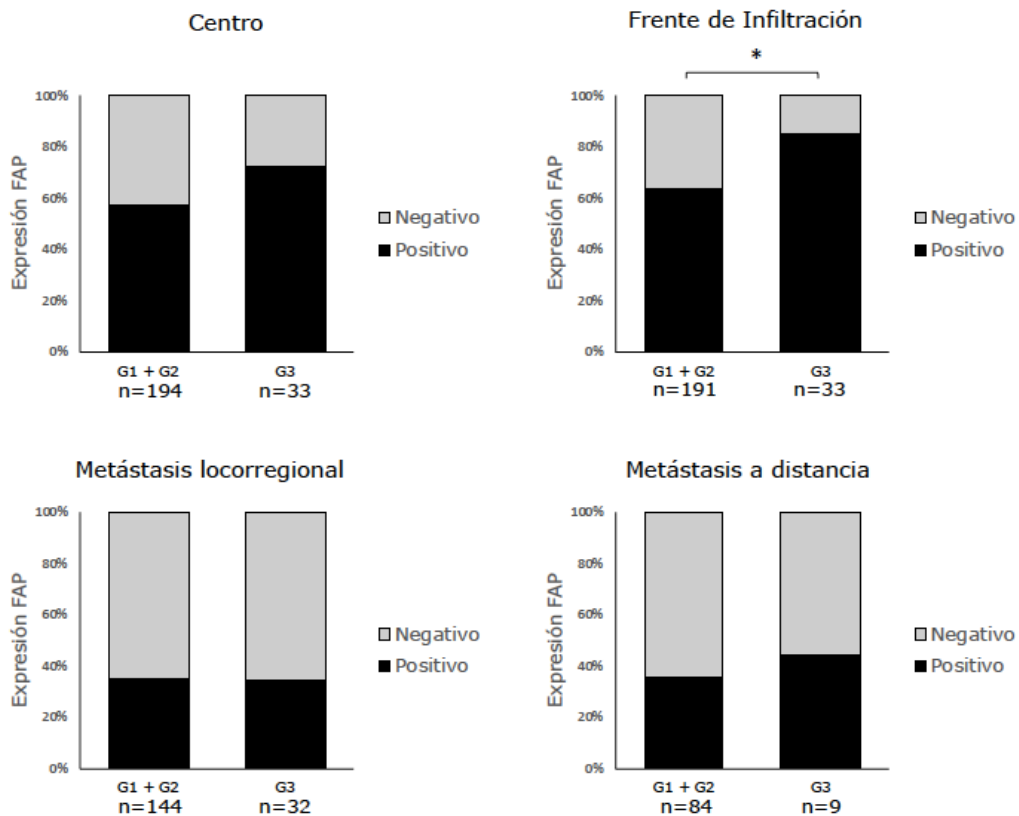


**Figura 4.3 Expresión inmunohistoquímica de FAP en las diferentes estaciones evolutivas del AdC.** a) (H&E 20x) Secciones histológicas representativas de mucosa de AdC en centro, borde de infiltración tumoral, metástasis locorregional y metástasis a distancia. b) Representación gráfica que ilustra la distribución de casos FAP+ y FAP- en base a la localización del tejido estudiado según el test de Chi-Cuadrado (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

### 4.3.2 Expresión de FAP y su asociación con variables clínicas y patológicas.

#### FAP y Grado Histológico

La estratificación en los grados histológicos I, II y III únicamente aportó resultados estadísticamente significativos en el frente de infiltración tumoral ( $p < 0,01$ ). Igualmente se realizó el test de Chi-Cuadrado en base a la actual tendencia a agrupar los CCR en bajo grado (G1 y G2) y alto grado (G3). Una vez más, con un 63,9% de positividad en los casos con bajo grado histológico y un 84,8% en los de alto grado se obtuvieron resultados estadísticamente significativos a nivel del frente de infiltración ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.4).



**Figura 4.4 Expresión inmunohistoquímica de FAP según grado histológico.** Representación gráfica que ilustra la distribución de casos FAP+ y FAP- agrupados en bajo grado (G1 y G2) y alto grado (G3) histológico en base a la localización del tejido estudiado según el test de Chi-Cuadrado. Sólo se observaron resultados estadísticamente significativos a nivel del borde de infiltración del tumor primario (\* $p < 0,05$ ).

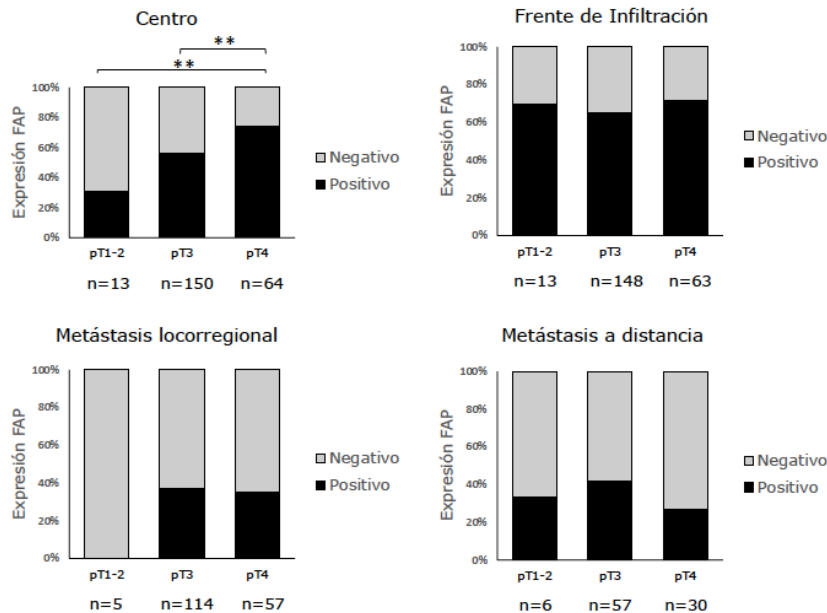
### **FAP e Invasión Local (pT)**

Al tratarse de una serie de tumores avanzados, se agruparon los pocos casos con niveles de invasión submucosa (pT1) y de invasión muscular propia (pT2) en un único grupo (pT1-pT2), y se compararon con los AdC que invadieron subserosa o grasa adventicial (pT3) y peritoneo visceral (pT4) (Figura 4.5).

Los resultados mostraron un aumento progresivo de la expresión de FAP en el centro del tumor en los tres niveles (31%, 56% y 75%, respectivamente) ( $p < 0,01$ ). Por el contrario, no se apreciaron estas diferencias al realizar la misma comparación en el borde del tumor primario.

Cabe destacar que en los tumores pT1-pT2, observamos una diferencia importante en la expresión de FAP entre el centro (30.8% positivo) y el borde (69.2% positivo), aunque esta no alcanzó significación estadística ( $p = 0.05$ ), probablemente debido a los pocos casos analizados.

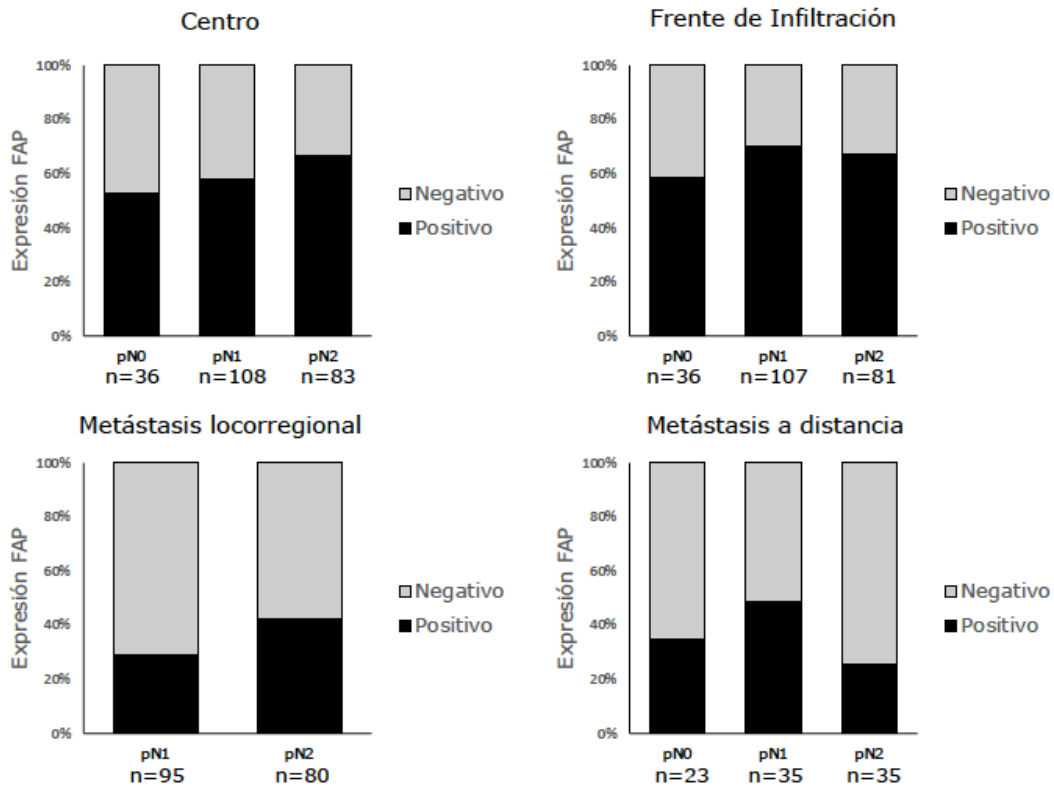
En las metástasis en ganglio linfático se observó una tendencia interesante. La expresión de FAP fue negativa cuando estas metástasis locales provenían de tumores primarios diagnosticados en estadios de invasión local bajos (pT1-pT2), y fue positiva en un tercio de los casos en las que provenían de tumores pT3 y pT4. Aunque la tendencia parece clara, esta no alcanzó significación estadística (pT1-pT2 vs pT3,  $p = 0.09$ ; pT1-pT2 vs pT4,  $p = 0.1$ ). En las metástasis a distancia no se observaron cambios significativos (Figura 4.5).



**Figura 4.5 Expresión inmunohistoquímica de FAP según invasión local (pT).** Representación gráfica que ilustra la distribución de casos FAP+ y FAP- según el nivel de infiltración mural (pT1-pT2, pT3 y pT4) en base a la localización del tejido estudiado según el test de Chi-Cuadrado. Sólo se observaron resultados estadísticamente significativos a nivel de centro del tumor primario (\*\* $p < 0,01$ ).

**FAP y Metástasis Ganglionar Locorregional (pN)**

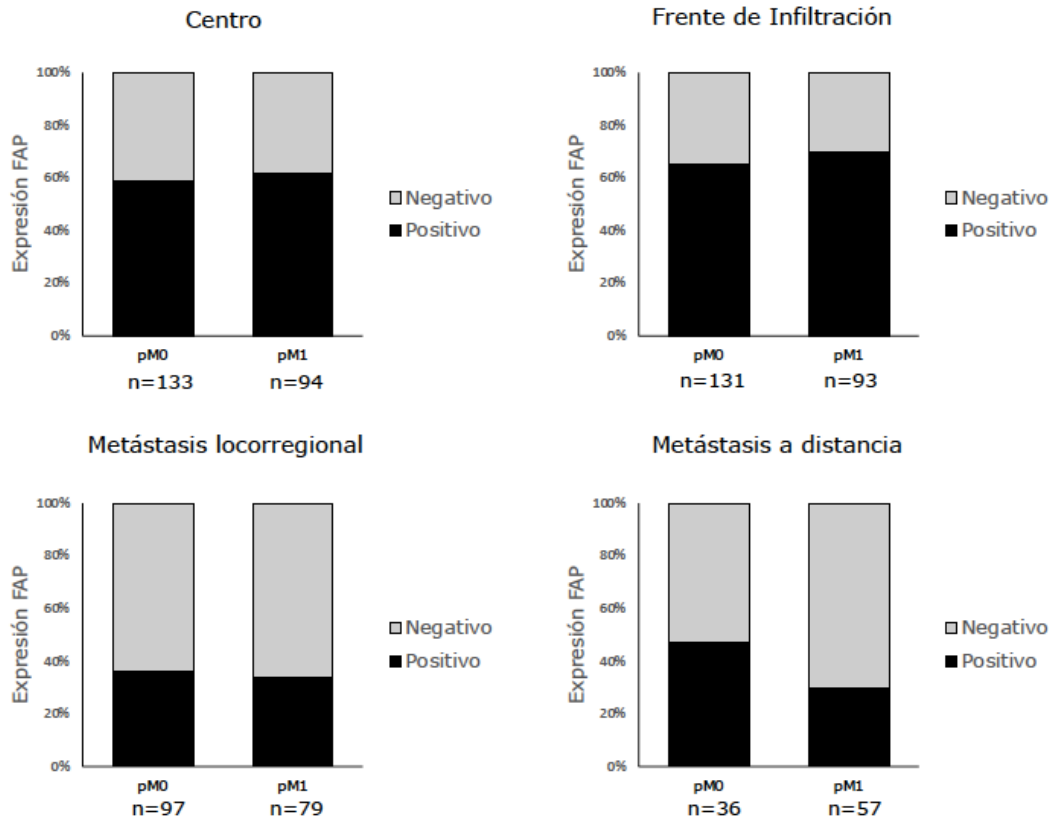
La expresión de FAP en los tumores primarios y en las metástasis no se asoció a la presencia de invasión de ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico ( $p > 0.05$ ) (Figura 4.6).



**Figura 4.6 Expresión inmunohistoquímica de FAP según invasión locorregional (pN).** Representación gráfica que ilustra la distribución de casos FAP+ y FAP- agrupados según número de ganglios linfáticos perintestinales afectados (pN) en base a la localización del tejido estudiado según el test de Chi-Cuadrado. Como es de esperar no existe tumoración ganglionar a estudio en aquellos casos que en el momento del diagnóstico no presentaban metástasis locorregional de AdC (pN0).

**FAP y Metástasis a Distancia (M)**

La expresión de FAP en los tumores primarios y en las metástasis no se asoció a la presencia de metástasis sistémica hepática ( $p > 0.05$ ) (Figura 4.7).

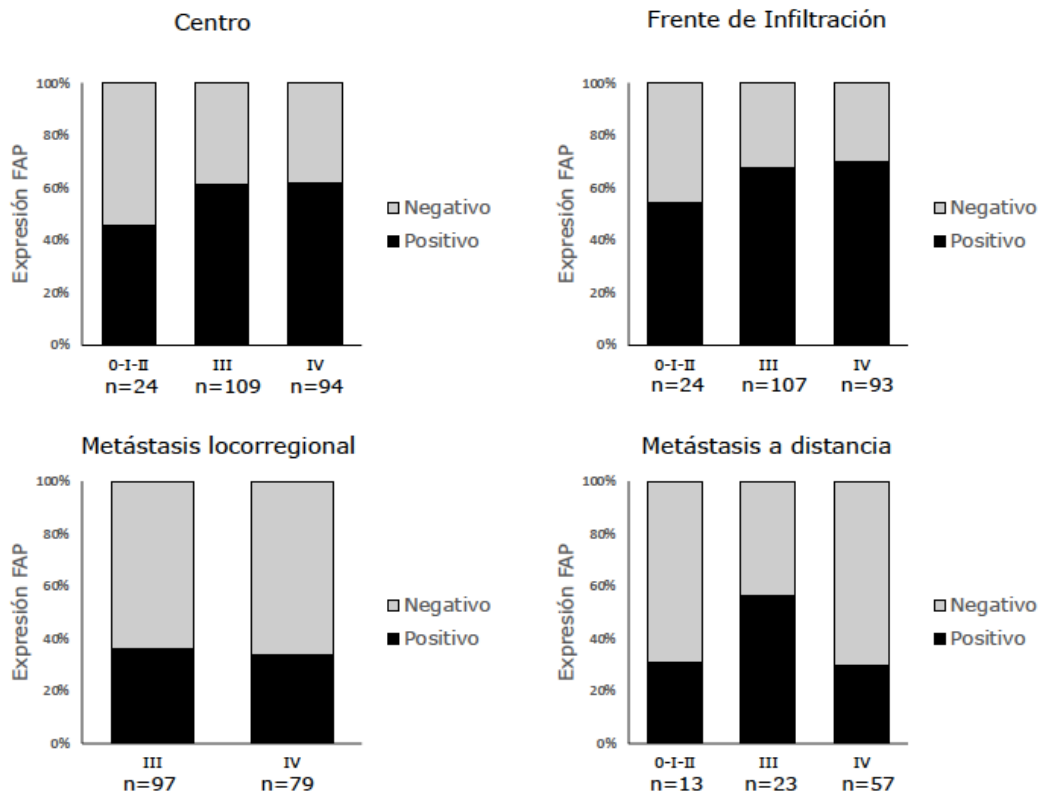


**Figura 4.7 Expresión inmunohistoquímica de FAP según metástasis a distancia (M).** Representación gráfica que ilustra la distribución de casos FAP+ y FAP- agrupados en base a si los pacientes presentaron o no metástasis hepática en el momento del diagnóstico atendiendo a la localización del tejido estudiado según el test de Chi-Cuadrado.



### **FAP y Estadío Tumoral**

La inmunoexpresión de FAP atendiendo a su estadío limitado a pared intestinal (0-I-II), extensión a ganglios linfáticos perintestinales (III) o metástasis a distancia (IV) en el momento del diagnóstico aportó una tendencia creciente a nivel de centro y borde de la tumoración, más acentuada entre los casos de AdC estadios 0-I-II y III; sin embargo, ésta no resultó estadísticamente significativa ( $p>0,05$ ) (Figura 4.8).



**Figura 4.8 Expresión inmunohistoquímica de FAP según estadío.** Representación gráfica que ilustra la distribución de casos FAP+ y FAP- agrupados por estadificación neoplásica en el momento del diagnóstico atendiendo a la localización del tejido estudiado según el test de Chi-Cuadrado.

**FAP y Supervivencia Cáncer-Específica (CSS)**

Con intención de definir el papel que puede desempeñar FAP en la supervivencia cáncer-específica (*Cancer-specific survival* o *CSS*) de los pacientes afectados por AdC a los 5 y 10 años desde el momento del diagnóstico, se aplicó el test Log-Rank atendiendo a los resultados de expresión de FAP en borde y centro de la tumoración primaria, metástasis locorregional y metástasis a distancia. En ninguna de las cuatro fases evolutivas del tumor se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1. Supervivencia cáncer-específica de los pacientes afectados por Adc según inmunoexpresión de FAP.** El test Log-Rank estableció que FAP no permite predecir la supervivencia a los 60 y 120 meses desde el momento del diagnóstico

Localización	Seguimiento	Log-Rank (p=)
Centro	5 años	0,708
	10 años	0,938
Borde	5 años	0,464
	10 años	0,318
Metástasis locorregional	5 años	0,861
	10 años	0,883
Metástasis a distancia	5 años	0,489
	10 años	0,455

**FAP y Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS)**

Todos los pacientes, una vez desarrollada la intervención quirúrgica e independientemente del estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico, iniciaron un periodo de tiempo libre de enfermedad (*Disease-free survival o DFS*) clínica, radiológica y patológica que se prolongó hasta su recaída en forma de recidiva local en la pared intestinal o metástasis hepática a distancia. Una vez más el test Log-Rank no puso de manifiesto diferencias estadísticamente significativas a los 5 y 10 años hasta la recaída de la neoplasia ( $p>0,05$ ) (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2 Supervivencia libre de enfermedad de los pacientes afectados por AdC según inmunoexpresión de FAP.** El test Log-Rank estableció que FAP no permite predecir el tiempo libre de enfermedad a los 60 y 120 meses desde el momento de la extirpación quirúrgica de la enfermedad atendiendo a su inmunoexpresión en centro, borde, metástasis en ganglio linfático y metástasis a distancia.

Localización	Seguimiento	Log-Rank (p=)
Centro	5 años	0,915
	10 años	0,928
Borde	5 años	0,722
	10 años	0,708
Metástasis locorregional	5 años	0,254
	10 años	0,223
Metástasis a distancia	5 años	0,558
	10 años	0,668

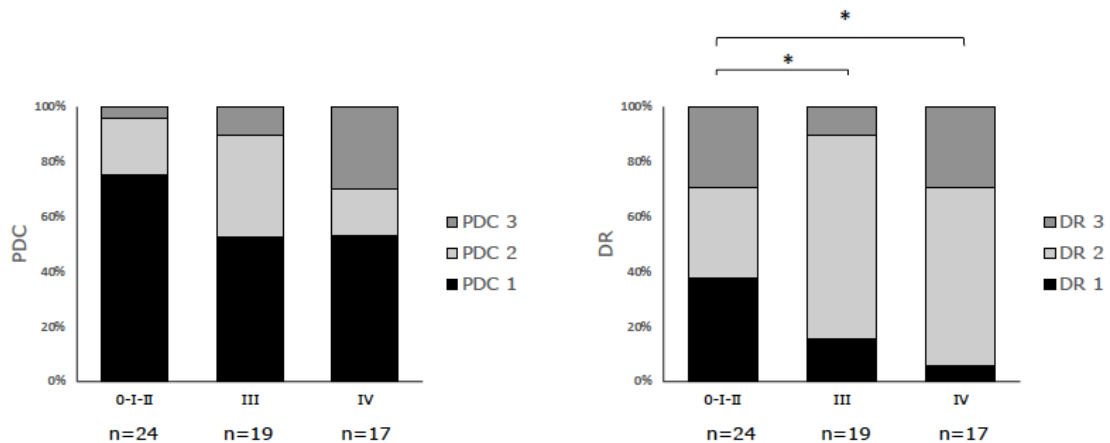
### 4.3.3 Estudio del programa EMT en el AdC

La posible influencia del programa EMT en el CCR se evaluó atendiendo a los dos rasgos histológicos (PDC y DR) que definen dicho programa en el subgrupo de 60 casos de Adc. Además de tomar como referencia el estadio tumoral, dos parámetros esenciales que definen la agresividad de la neoplasia en la interfase tumor-estroma peritumoral del huésped, como son el grado histológico y la invasión local (pT), sirvieron para estratificar los resultados obtenidos. Asimismo, se analizó la relación de PDC/FAP y DR/FAP en el borde de infiltración.

#### PDC y DR según Estadio

El conteaje de PDCs siguió una tendencia creciente, aunque no estadísticamente significativa ( $p=0,104$ ) a medida que se incrementaba el estadio. En este sentido resultaba más frecuente contabilizar mayor número de islotes celulares pobremente diferenciados en AdC que debutaban con metástasis a distancia, respecto a aquellos casos limitados a pared intestinal o localmente avanzados.

Algo diferente resultó la distribución de los tres tipos de estroma peritumoral descritos. Las diferencias estadísticamente significativas observadas en su conjunto pudieron atribuirse a que el estroma maduro hojaldrado de estadios iniciales cedía terreno al estroma queiloide intermedio desarrollado en los estadios III y IV (Figura 4.9).

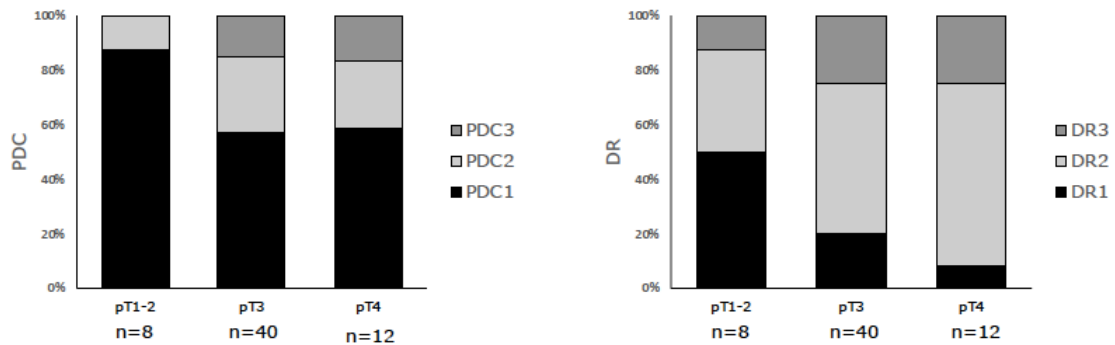


**Figura 4.9 Estudio de PDC y DR según estadio.** Representación gráfica que ilustra la distribución del conteaje de PDC y la caracterización del estroma peritumoral en base al estadio según el test de Chi-Cuadrado. Sólo se observaron resultados estadísticamente significativos en el estudio de DR (\* $p<0,05$ ).

### **PDC y DR según Invasión Local (pT)**

Una vez más, atendiendo a la escasez de casos de la serie en los que el tumor primario estaba confinado a estratos submucoso y muscular propio, se optó por analizar las variables PDC y DR de acuerdo al nivel de infiltración pT1 y pT2 conjuntamente, pT3 y pT4.

La tendencia tanto en PDC como en DR indicaba que a mayor nivel de infiltración local existía mayor contaje de PDC y mayor inmadurez estromal. En ambos casos la diferencia, que no resultó estadísticamente significativa, fue más acentuada entre los grupos pT1-2 y pT3 en los que la cuantificación de PDC 2 pasó del 12,5% al 27,5% y el número de tumores con estroma queiloide pasó del 37,5% al 55%, respectivamente (Figura 4.10).



**Figura 4.10 Estudio de PDC y DR según pT.** Representación gráfica que ilustra la distribución del contaje de PDC y la caracterización del estroma peritumoral en base al nivel de invasión local (pT) según el test de Chi-Cuadrado.

**PDC y DR según Grado Histológico**

La distribución de PDC y DR atendiendo al grado histológico no siguió una tendencia concreta. Es cierto que en los AdC grado 3 el número de casos PDC 3 se incrementaba hasta alcanzar el 33,3%. No obstante, este dato resultaba cuanto menos contradictorio al apreciar que en los AdC grado 2 no sólo no existía una interfase creciente de PDCs, sino que estos disminuían pasando a engrosar la lista de casos con PDC 1.

En cuanto a DR, se observaron unos valores similares entre los AdC grado 1 y 2, pese a que los escasos AdC grado 3 parecían inclinarse hacia el desarrollo de un estroma con tintes queiloideos ( $p>0,05$ ) (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3. Estudio de PDC y DR según grado histológico.** Exposición de valores absolutos y porcentuales de la distribución de 60 casos de diferente grado histológico en base a la cuantificación de PDC y estudio de DR.

	<b>PDC 1</b>	<b>PDC 2</b>	<b>PDC 3</b>	<b>DR 1</b>	<b>DR 2</b>	<b>DR 3</b>
<b>Grado 1</b>	5 (45,5%)	4 (36,4%)	2 (18,2%)	3 (27,3%)	5 (45,5%)	3 (27,3%)
<b>Grado 2</b>	30 (69,8%)	9 (20,9%)	4 (9,3%)	9 (20,9%)	23 (53,5%)	11 (25,6%)
<b>Grado 3</b>	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0 (0%)

**FAP y PDC/DR**

La expresión inmunohistoquímica de FAP en el borde de infiltración tumoral siguió una tendencia creciente a medida que aumentaba la cuantificación de islotes de PDC en el frente. Dicha inmunoexpresión arrojó resultados positivos ya en niveles bajos de PDC por lo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos ( $p>0,05$ ) (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4. Estudio de PDC según FAP.** Exposición de valores absolutos y porcentuales de la distribución de los diferentes niveles de PDC en base a la inmunoexpresión de FAP.

	<b>FAP (-)</b>	<b>FAP (+)</b>
<b>PDC 1</b>	13 (37,1%)	22 (62,9%)
<b>PDC 2</b>	5 (35,7%)	9 (64,3%)
<b>PDC 3</b>	1 (12,5%)	7 (87,5%)

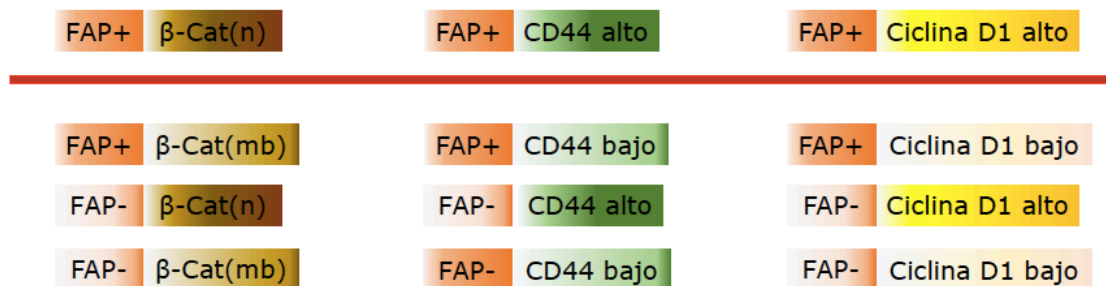
Por su parte no se apreció correlación entre los diferentes tipos de estroma peritumoral y la expresión inmunohistoquímica de FAP. Si bien existió mínimo aumento del número de casos FAP+ en DR2 respecto a DR1, la tendencia fue decreciente al comparar los casos DR2 y DR3 (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5. Estudio de DR según FAP.** Exposición de valores absolutos y porcentuales de la distribución de los diferentes tipos de DR en base a la inmunoexpresión de FAP.

	FAP (-)	FAP (+)
<b>DR 1</b>	5 (38,5%)	8 (61,5%)
<b>DR 2</b>	10 (31,3%)	22 (68,8%)
<b>DR 3</b>	4 (33,3%)	8 (66,7%)

#### 4.4 ESTUDIO DE FAP Y OTROS MARCADORES DE MICROAMBIENTE TUMORAL

La expresión de FAP como un marcador de CAFs invita a analizar su implicación en mecanismos esenciales de la carcinogénesis como son la desdiferenciación citológica, el mantenimiento de la pluripotencialidad y la proliferación celular. Para ello, se ha estudiado la relación entre diferentes combinaciones de expresión de FAP y  $\beta$ -Catenina (programa EMT), FAP y CD44 (células madre), y FAP y Ciclina D1 (proliferación), para valorar si dichas asociaciones son capaces de predecir metástasis a distancia, supervivencia cáncer-específica y supervivencia libre de enfermedad (Figura 4.11).



**Figura 4.11. Ilustración de las diferentes combinaciones de marcadores inmunohistoquímicos de microambiente tumoral.** Se estudió la asociación entre los casos FAP+ y  $\beta$ -Catenina nuclear, FAP+ y CD44 alto y FAP+ y Ciclina D1 alto respecto al resto de combinaciones posibles entre cada pareja de marcadores. El análisis se realizó en el centro de tumor primario, frente de infiltración y en el ganglio linfático tumoral (el menor número de muestras metastásicas hepáticas limitó la posibilidad de hacer un análisis combinado).

Las combinaciones fueron las siguientes: 1) FAP positivo en CAFs y  $\beta$ -Catenina nuclear en células tumorales frente al resto de combinaciones entre estos marcadores; 2) FAP positivo y alta expresión de CD44 frente al resto de combinaciones; y 3) FAP positivo y alta expresión de ciclina D1 frente al resto de combinaciones (Figura suplementaria S1).

En cuanto a la asociación entre alguna de estas combinaciones con la aparición de metástasis a distancia, pudimos ver que la co-expresión de FAP en los CAFs y la tinción nuclear de  $\beta$ -Catenina en las células tumorales en el frente de infiltración tumoral predice de forma independiente la aparición de dicha metástasis ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y BCAT nuclear en el frente de infiltración.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo fue estadísticamente significativo ( $p=0,002$ ). Test Hosmer–Lemeshow ( $p = 0,7$ ). R2 Nagelkerke ( $p=0.1$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

FRETE DE INFILTRACIÓN						
	Variables	p valor	B	OR	Inferior	Superior
Regresión Logística Múltiple	Grado	0,745	-0,085	0,919	0,552	1,529
	pT	<b>0,005</b>	0,793	2,209	1,270	3,842
	pN	0,349	0,203	1,225	0,801	1,871
	<b>FAP(+)/<math>\beta</math>CAT(N)</b>	<b>0,026</b>	0,857	2,355	1,107	5,011
Paso final del método de Wald	pT	<b>0,001</b>	0,865	2,374	1,396	4,039
	<b>FAP(+)/<math>\beta</math>CAT(N)</b>	<b>0,022</b>	0,878	2,405	1,132	5,108

El resto de combinaciones tanto en tumor primario como en metástasis ganglionares no mostró ningún resultado significativo a la hora de predecir metástasis (Tablas Suplementarias S3-S10). Conviene mencionar que en la totalidad de los casos no se apreció pérdida de expresión de E-cadherina ni inmunorreactividad para vimentina en las células tumorales de las diferentes localizaciones estudiadas.

En cuanto a la asociación con la supervivencia de los pacientes, la expresión FAP+ y  $\beta$ -Catenina nuclear en el frente de infiltración predice peor supervivencia

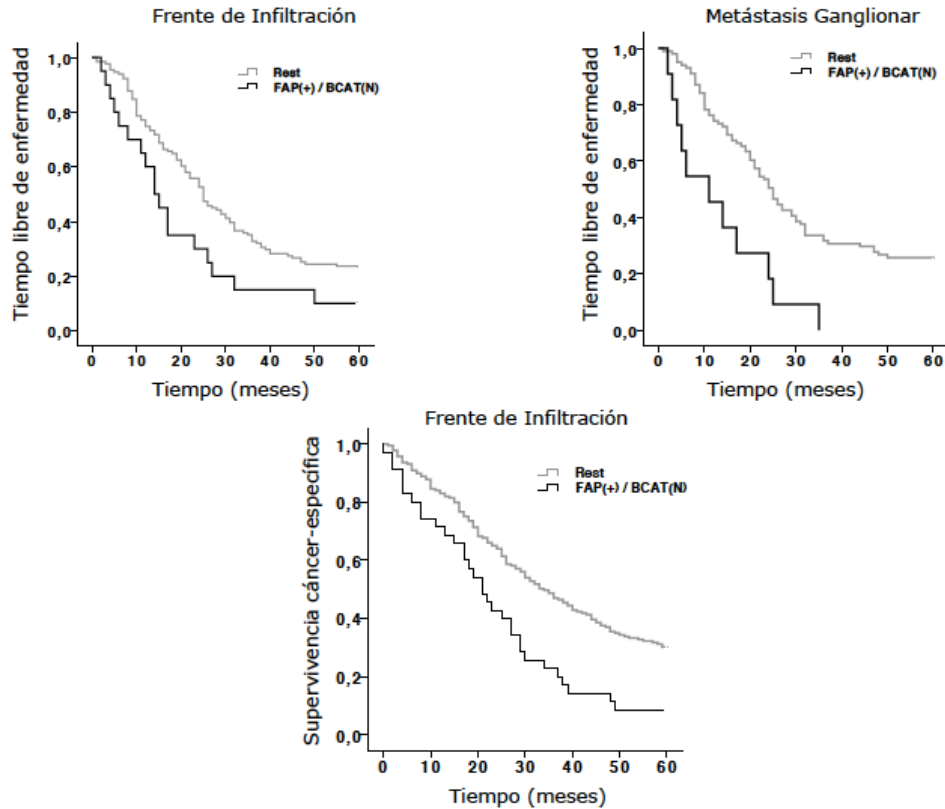


cáncer-específica a los 5 y 10 años. Más aún, dicho perfil inmunohistoquímico tanto en el frente de invasión como en la metástasis locorregional en ganglio linfático se relacionan con una disminución del tiempo libre de enfermedad a los 5 y 10 años. (Tabla 4.7 y Figura 4.12)

El resto de combinaciones no mostró ninguna asociación con la supervivencia cáncer-específica ni con la libre de enfermedad (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7. Resultados del test Log-rank para la asociación de FAP+/β-Catenina nuclear, FAP+/CD44 alto y FAP+/Ciclina D1 alto respecto a la supervivencia cáncer-específica y tiempo libre de enfermedad a 60 y 120 meses en los pacientes con AdC.** La combinación de FAP+/β-Catenina nuclear en el frente de invasión del tumor primario predice peor supervivencia cáncer-específica a los 5 y 10 años ( $p < 0,001$ ) y disminución en el tiempo libre de enfermedad ( $p < 0,05$ ). Esta misma combinación en el ganglio linfático se asocia a un acortamiento en el tiempo libre de enfermedad ( $p < 0,001$ )

<b>FAP(+)/βCAT(N)</b>	<b>5-CSS</b>	<b>10-CSS</b>	<b>5-DFS</b>	<b>10-DFS</b>
<b>(Localización)</b>	<b>(p valor)</b>	<b>(p valor)</b>	<b>(p valor)</b>	<b>(p valor)</b>
Centro de Tumor	0,94	0,54	0,86	0,82
Frente de Infiltración	<b><math>3,3 \times 10^{-4}</math></b>	<b>0,001</b>	<b>0,024</b>	<b>0,033</b>
Metástasis ganglionar	0,07	0,07	<b><math>5 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>5 \times 10^{-4}</math></b>
Metástasis a distancia	0,98	0,5	0,86	0,95
<b>FAP(+)/CD44 alto</b>				
Centro de Tumor	0,72	0,98	0,71	0,95
Frente de Infiltración	0,34	0,47	0,22	0,46
Metástasis ganglionar	0,39	0,17	0,06	0,06
Metástasis a distancia	0,97	0,76	0,63	0,72
<b>FAP(+)/CiclinaD1 alto</b>				
Centro de Tumor	0,5	0,83	0,84	0,81
Frente de Infiltración	0,71	0,46	0,37	0,78
Metástasis ganglionar	0,22	0,15	0,15	0,09
Metástasis a distancia	0,29	0,11	0,49	0,5



**Figura 4.12. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia cáncer-específica en pacientes con AdC en base a la combinación de FAP+ y  $\beta$ -Catenina nuclear.** Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier reflejan la disminución del tiempo libre de enfermedad a los 60 meses de seguimiento en aquellos casos que muestran un perfil FAP+ y  $\beta$ -Catenina nuclear en frente de infiltración y ganglio linfático. La supervivencia cáncer-específica decrece significativamente a los 60 meses en aquellos casos FAP+ y  $\beta$ -Catenina nuclear en el frente de invasión.

Para saber si la combinación de expresión FAP+ y  $\beta$ -Catenina nuclear en el borde de infiltración y en las metástasis locorregionales es un factor pronóstico independiente para la supervivencia, se realizó una Regresión de Cox. En primer lugar, se hizo un análisis univariante donde se incluyeron, además de esta combinación, diferentes variables patológicas con reconocido valor pronóstico (Tabla suplementaria S11). Las variables que una a una fue significativas para predecir supervivencia, se incluyeron en el análisis multivariante posterior.

El análisis multivariante demostró que la combinación de FAP+ y  $\beta$ -Catenina nuclear en el borde de infiltración es, junto con el grado, pT y la metástasis, un factor pronóstico independiente para la supervivencia cáncer-específica a los 5 años (Tabla 4.8 y Figura 4.13).

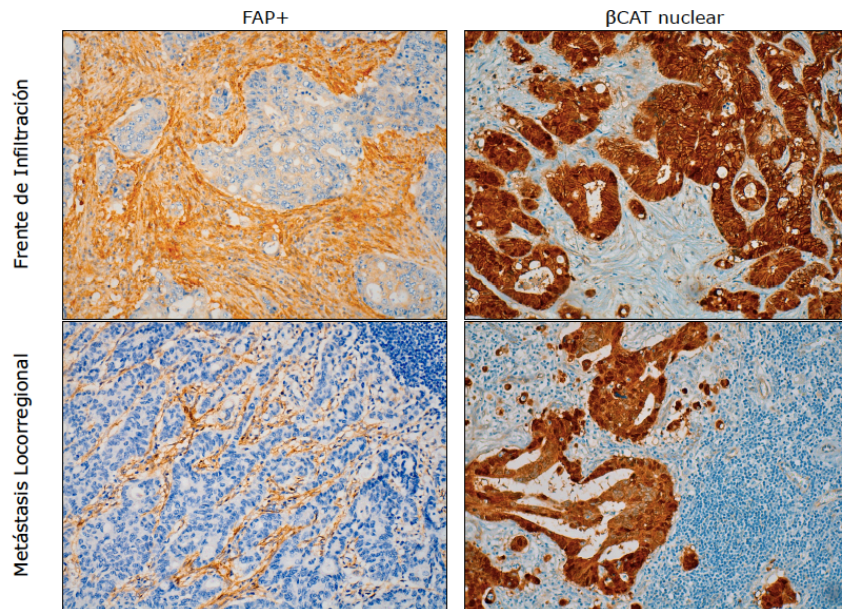
**Tabla 4.8. Análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/βCAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario para predecir supervivencia cáncer-específica a los 5 años.** Se incluyen Odds ratio (OR) e intervalos de confianza inferior y superior al 95%.

<b>FRENTE INFILTRACION / 5-CSS</b>					
	<b>Variabes</b>	<b>p valor</b>	<b>OR</b>	<b>Inf.</b>	<b>Sup.</b>
<b>Regresión de Cox Múltiple</b>	<b>FAP(+)/βCAT(N)</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,201	1,086	1,328
	<b>Grado</b>	<b>0,007</b>	1,490	1,115	1,991
	<b>pT</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,886	1,387	2,565
	<b>N</b>	0,962	0,994	0,785	1,259
	<b>M</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,881	1,376	2,569
<b>Paso final del método de Wald</b>	<b>FAP(+)/βCAT(N)</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,201	1,086	1,327
	<b>Grado</b>	<b>0,006</b>	1,487	1,122	1,971
	<b>pT</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,882	1,402	2,527
	<b>M</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,880	1,376	2,567

Esta misma combinación en el frente y en el ganglio, es también un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años (Tabla 4.9 y Figura 4.13). Los resultados para la supervivencia cáncer-específica y libre de enfermedad a los 10 años fueron igualmente significativos (Tablas suplementarias S12 y S13).

**Tabla 4.9. Análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/ $\beta$ CAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario y metástasis en ganglio linfático para predecir tiempo libre de enfermedad a los 5 años.** Se incluyen Odds ratio (OR) e intervalos de confianza inferior y superior al 95%.

		Frente de infiltración / 5-DFS				Metástasis locorregional 5-DFS			
Variables		p valor	OR	Inf.	Sup.	p valor	OR	Inf.	Sup.
Regresión de Cox Múltiple	FAP(+)/ $\beta$ CAT(N)	<b>0,011</b>	1,180	1,038	1,341	<b>0,002</b>	1,293	1,098	1,522
	Grado	0,174	1,290	0,893	1,863	0,730	1,079	0,700	1,665
	pT	<b>0,018</b>	1,588	1,084	2,326	<b>0,009</b>	1,750	1,147	2,668
	N	0,723	1,054	0,788	1,411	0,408	1,212	0,769	1,910
Paso final del método de Wald	FAP(+)/ $\beta$ CAT(N)	<b>0,016</b>	1,169	1,030	1,327	<b>0,001</b>	1,308	1,113	1,538
	pT	<b>0,008</b>	1,650	1,138	2,392	<b>0,005</b>	1,803	1,189	2,734

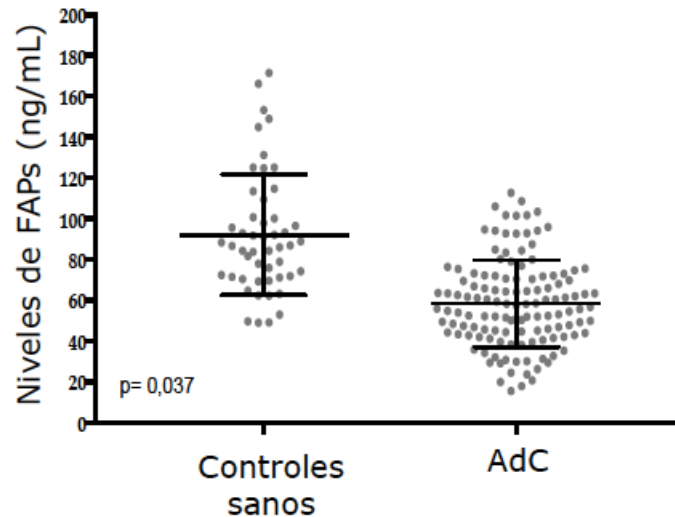


**Figura 4.13. Expresión inmunohistoquímica de FAP y  $\beta$ -Catenina en frente de infiltración tumoral y ganglio linfático.** La sobreexpresión de FAP en los fibroblastos del frente de infiltración y ganglio linfático cuando se asocia a la expresión nuclear de  $\beta$ -Catenina en la célula tumoral de dichas localizaciones puede predecir peor supervivencia cáncer-específica y disminución en el tiempo libre de enfermedad.

#### 4.5 ESTUDIO DE FAP SOLUBLE EN PLASMA DE PACIENTES CON AdC

Los niveles de FAPs se midieron en el plasma de pacientes con AdC y sujetos control. No existió tampoco en este caso ninguna correlación entre estos niveles y la edad y sexo (correlación de Pearson,  $p > 0.05$  en ambos casos).

La cuantificación de FAPs en plasma reflejó que sus niveles eran menores en los pacientes con AdC respecto a los sujetos sanos (T Student,  $p < 0.05$ ).



**Figura 4.14. Niveles de FAPs en plasma de sujetos controles sanos y pacientes con AdC.** La concentración de FAPs en AdC es inferior a la de los sujetos sanos (T Student,  $p < 0.05$ ).

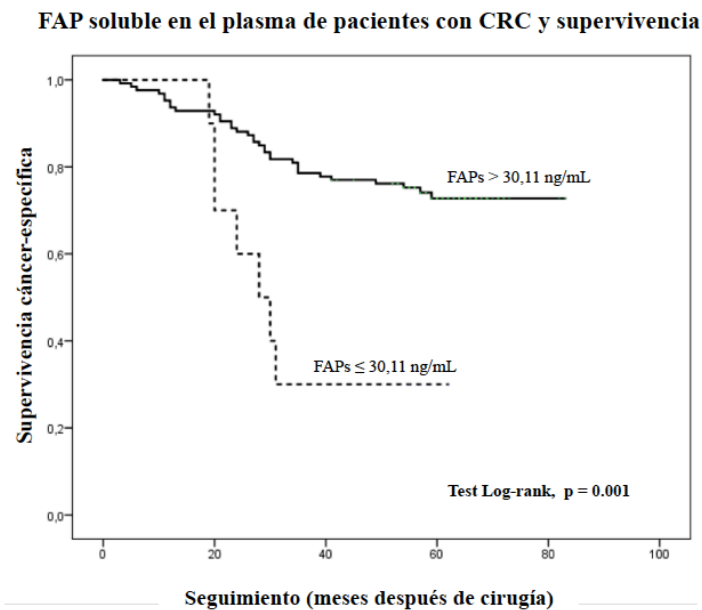
Al estratificar los resultados según variables patológicas, pudimos observar una correlación inversa entre niveles FAPs y tamaño del tumor (correlación Pearson,  $r = -0.291$ ,  $p = 0.001$ ). Además, los niveles de FAPs en el plasma fueron significativamente inferiores en los casos con invasión de vasos linfáticos (T Student,  $p = 0.03$ ). También se observó una tendencia parecida en pacientes diagnosticados con grado, pT, y pN altos, donde los niveles de FAPs eran inferiores (Tabla 4.10).

**Tabla 4.10. Niveles de FAPs según parámetros clínico-patológicos en pacientes con AdC.** Se utilizaron el test de la T de student y ANOVA para la comparación de dos o más grupos respectivamente.

Parámetros clínico-patológicos (n=127)		Media (%)	Niveles FAPs (ng/mL)	p valor
Seguimiento (meses)		50 (3-83)		
Edad		70 (34-93)		
Sexo	Hombre	92 (72%)	57,9	0,61
	Mujer	35 (28%)	60,1	
Grado Histológico (G)	G1	6 (5%)	57,4	0,92
	G2	118 (93%)	58,7	
	G3	3 (2%)	53,7	
Invasión local (pT)	pT2	32 (25%)	60,3	0,41
	pT3	85 (67%)	58,9	
	pT4	10 (8%)	50,1	
Extensión locorregional (pN)	pN0	75 (59%)	60,2	0,41
	pN1	41 (32%)	57,4	
	pN2	11 (9%)	51,4	
Metástasis a distancia (M)	M0	123	58,4	0,75
	M1	4	61,9	
Estadio	I	26 (20%)	56,9	0,29
	II	48 (38%)	62,9	
	III	49 (39%)	54,8	
	IV	4 (3%)	61,9	
Invasión vascular venosa (V)	No	110 (87%)	58,6	0,97
	Yes	17 (13%)	58,3	
Invasión vascular linfática (L)	No	103 (81%)	60,6	0,03
	Yes	24 (19%)	49,8	
Invasión perineural (Pn)	No	108 (85%)	58,5	0,99
	Yes	19 (15%)	58,7	

Para el análisis de supervivencia hicimos puntos de corte obtenidos mediante árboles de decisión (CRT) (Figura Suplementaria S2). Un valor de 30.11 ng/mL determinó dos grupos con diferencias significativas en el porcentaje de pacientes vivos, uno de ellos con un 30% y el otro con un 74% ( $p=0.03$ ).

Las curvas de Kaplan-Meier pusieron de manifiesto que aquellos pacientes con valores iguales o inferiores al señalado (FAPs  $\leq 30.11$  ng/mL) tenían peor supervivencia cáncer-específica que los pacientes con valores de FAPs superiores a 30.11 ng/mL (Test de Log-rank  $p=0,001$ ) (Figura 4.15).



**Figura 4.15. Supervivencia cáncer-específica en pacientes con AdC en base a niveles de FAPs.** La supervivencia disminuye significativamente a partir de los 20 meses de seguimiento en aquellos pacientes con niveles de FAPs iguales o inferiores a 30,11ng/mL ( $p=0,001$ ).

Asimismo, el análisis univariante y multivariante que aglutinó a FAPs (en su punto de corte FAPs  $\leq 30.11$  ng/mL), grado histológico, invasión local, metástasis locorregional y a distancia e invasión vascular y perineural, señaló a FAPs como un factor pronóstico independiente en la predicción de supervivencia global en los pacientes con AdC (Tabla 4.11).

**Tabla 4.11. Análisis multivariante (Modelo de Regresión de Cox) de variables clínico-patológicas y FAPs en pacientes con AdC para la predicción de supervivencia cáncer-específica.** Se incluyen Odds Ratio (OR) y sus intervalos de confianza al 95%.

		<b>5-CSS</b>			
		<b>Variab</b>	<b>p valor</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior Superior</b>
<b>Regresión de Cox Múltiple</b>	<b>FAPs</b>	<b>0,046</b>	0,356	0,129	0,983
	<b>Grado</b>	<b>0,044</b>	5,475	1,050	28,564
	<b>pT</b>	0,355	1,414	0,678	2,951
	<b>N</b>	0,264	1,353	0,796	2,300
	<b>M</b>	0,152	2,708	0,694	10,574
	<b>V</b>	0,100	2,008	0,875	4,609
	<b>Pn</b>	0,261	1,551	0,721	3,337
<b>Paso final del método de Wald</b>	<b>FAPs</b>	<b>0,001</b>	0,243	0,104	0,565
	<b>Grado</b>	<b>0,001</b>	12,474	2,854	54,527
	<b>M</b>	<b>0,007</b>	5,326	1,579	17,969
	<b>V</b>	<b>0,013</b>	2,653	1,229	5,728



# 5. DISCUSIÓN

## 5.1 EXPRESIÓN DE FAP EN LA SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA

El desarrollo de programas de cribado poblacional del CRC ha permitido en los últimos años aflorar un número considerable de casos no detectados por medio de las herramientas clínico-radiológicas habituales y homogenizar los diferentes grupos de estadificación en el momento del diagnóstico (104).

Además, ha sido posible extirpar numerosas lesiones premalignas cuyo curso evolutivo silente hubiera desembocado, con el transcurso de los años, en auténticos procesos neoplásicos infiltrantes. Ejemplo de ello son los más de 5.000 adenomas de bajo y alto riesgo que fueron diagnosticados en el País Vasco hace una década (2009-2011) en el inicio del cribado poblacional en esta comunidad autónoma (105). Los pólipos adenomatosos son los precursores más frecuentes del CRC y el conocimiento actual de su fisiopatología ha dotado a su estudio histológico, y viceversa, de unas herramientas descriptivas que, con mayor o menor precisión, permiten ubicar temporalmente la secuencia mutacional del mismo (17).

No obstante, en la práctica clínica y quirúrgica diaria el foco de atención no recae tanto en el conjunto de mutaciones que el pólipo haya podido ir acumulando hasta alcanzar capacidad infiltrativa. Es, precisamente, este último aspecto, es decir, que la celularidad epitelial proliferante haya rebasado su membrana basal limitante, lo que va a congregar a diferentes profesionales sanitarios en torno a una mesa común para tratar de frenar la expansión de dicha tumoración en el paciente.

La serie estudiada nos ha permitido analizar la expresión de FAP en pólipos adenomatosos con displasia de bajo grado sincrónicos a CCR en un total de 41 piezas de resección intestinal. Tal y como ha sido descrito en trabajos previos (106), FAP no se expresó en la mucosa normal ni en los adenomas y sí lo hizo, en diferente grado, en el CCR.

Esta diferencia entre la inmunexpresión de FAP en adenomas de bajo grado y en CCR en el que casi un 70% de las muestras neoplásicas analizadas fue FAP+ resulta ilusionante de cara a contar con un marcador inmunohistoquímico más en la toma de decisiones a la hora de valorar lesiones potencialmente malignas y lesiones

infiltrantes.

En este sentido, y dado que un diagnóstico de adenocarcinoma infiltrante sobre una lesión adenomatosa acarrea, como mínimo, una escisión completa del pólipo y, en caso de infiltración submucosa y otros parámetros histológicos de alto riesgo de diseminación nodal linfática, una extirpación quirúrgica con márgenes del segmento intestinal implicado (107) (108) (109), es esencial una correcta valoración de las características histológicas del pólipo adenomatoso que permitan hablar o no de franca infiltración.

La pseudoestratificación nuclear completa, la cromatina globulosa, la aproximación glandular e incluso el patrón arquitectural cribiforme de las criptas son características histológicas universales de adenomas con displasia intraepitelial de alto grado (110) que en un contexto de desmoplasia estromal y extensión a lo largo del eje conectivo del pólipo pueden sugerir infiltración mucosa/submucosa.

Existen situaciones en las que regueros de glándulas que profundizan a lo largo de la base conectiva de implantación del pólipo con muy buena diferenciación glandular y mínima o incluso nula inducción estromal pueden hacernos dudar entre una verdadera infiltración neoplásica o una imagen de pseudoinvasión glandular (110).

Situaciones más frecuentes son aquellas en las que, pese a que la atipia citológica y displasia arquitectural sugieren un proceso neoplásico infiltrante subyacente, la superficialidad de la muestra endoscópica no permite afirmarlo con certeza (111).

Claro está que la morfología celular y, sobre todo, la arquitectura de la lesión prima por encima del valor de FAP a la hora de determinar qué tipo de adenomas pueden sugerir infiltración de lámina propia. Estos casos son ejemplo de la variabilidad interobservador que existe aún hoy en día en cualquier laboratorio de anatomía patológica a la hora de evaluar un adenoma con displasia de alto grado y establecer los límites que inclinen la balanza hacia la infiltración o no de la lámina propia mucosa (112).

Nuestro estudio se ha limitado únicamente al análisis de expresión de FAP sobre pólipos con displasia de bajo grado, debido a la dificultad de recopilar lesiones con displasia de alto grado, menos frecuentes en la práctica diaria (113). Algunos estudios afirman que lesiones tumorales incipientes en las que existe una delimitación de membrana basal colagénica están embebidas en un estroma reactivo "protector" en el que abundan fibroblastos de tipo NAF (47). Esa es la condición que cumplen los adenomas con displasia intraepitelial de alto grado. En ellos cabría

esperar una ausencia de inmunexpresión de FAP, debido a la ausencia de CAFs. Ello cobra sentido, precisamente, porque como se mencionaba anteriormente, un rasgo característico de invasión neoplásica estromal es la reacción desmoplásica típica en lesiones infiltrantes, que se ha desarrollado entre otros por medio de la actividad peptidasa de FAP (47).

No obstante, y pese a utilizar estas bases teóricas para aventurarnos a extrapolar los resultados obtenidos en adenomas con displasia de bajo grado a adenomas con displasia de alto grado, es conveniente dar continuidad a este estudio sobre muestras de pólipos adenomatosos con displasia intraepitelial de alto grado e incluso combinar la expresión de FAP con otros marcadores contrastados en este tipo de situaciones como son MMP-1, P53, E-Cadherina y Colágeno IV (114). Sólo así podremos hablar con mayor propiedad sobre el valor predictivo de FAP como marcador de infiltración tumoral en este tipo de pólipos.

## **5.2. EXPRESIÓN DE FAP EN LOS DIFERENTES SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CCR**

Las características histológicas son las que definen la morfología y frecuentemente la mayor o menor agresividad de una tumoración. En este estudio, la proporción de casos AdC que expresan FAP en el frente de infiltración tumoral es significativamente superior a la de MuC y SrcC. De la misma manera, a nivel intratumoral, aunque no de forma significativa, se aprecia una tendencia similar. Es razonable pensar, por tanto, que los rasgos histológicos también pueden interferir en la expresión de esta proteína.

MuC y SrcC son dos tumores con amplias áreas de degeneración mucinosa, entre las que se dispone de forma discohesiva la celularidad proliferante, y por lo tanto disponen de menor matriz estromal colagénica que es, en esencia, hábitat de los fibroblastos objeto de estudio de este trabajo (9). Esta podría ser una razón de la baja expresión de FAP en estos dos tumores frente a los AdC.

Existe también la posibilidad de que el cada vez más determinante trasfondo molecular pueda explicar estas diferencias. MuC y SrcC son dos subtipos de CCR más frecuentemente asociados con la Inestabilidad de Microsatélites (IMS) (19), perfil molecular que permitiría de forma genérica englobarlos con mayor probabilidad en el subtipo 1 (CMS-1) del consenso de subtipificación molecular (36) (115). Se trata, éste, de un grupo de CCR que presenta un perfil molecular que no favorece, a diferencia del CMS-4, la sobreexpresión de proteínas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular y activación mesenquimal (115). Esto podría redundar en

una menor presencia de CAFs y, por lo tanto, en menor expresión de FAP.

Uno de los rasgos que caracteriza a los CCR que se han desarrollado a través de la vía de la Inestabilidad de Microsatélites es la mayor respuesta inmunitaria contraria a la tumoración por parte del huésped. Histológicamente esta reacción inflamatoria que, se ha vinculado con un mejor pronóstico en este tipo de pacientes, se traduce en un aumento de la densidad de los linfocitos intra y peritumorales (11). Precisamente la menor expresión de FAP respecto a los casos de Adc podría ser una de las causas por las que en los subtipos MuC y SrcC, esta función antitumoral del sistema inmune resultaría fortalecida. Y es que se ha descrito que FAP es capaz de obstaculizar mediante mecanismos indirectos la actividad de los linfocitos T citotóxicos (81).

Esta última hipótesis requeriría al menos de un screening de base del estado de las proteínas MMR en las muestras analizadas. Screening, éste, que pese a ser una realidad constante en la rutina diagnóstica diaria actual que incluso abarca más casos de los estrictamente definidos por los criterios de Amsterdam y Bethesda (9), no fue realizado en el momento del diagnóstico en la mayor parte de muestras de nuestra serie debido a que la mayoría fueron casos antiguos de cuando estos análisis no entraban en la rutina clínica diaria. Los posibles falsos negativos de la expresión de MMR en los cores de los TMA debido a la heterogeneidad tumoral de estos cuatro marcadores estandarizados (MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6) (116) (117), pero fundamentalmente y, tras haberlo valorado de inicio, haber querido cimentar esta tesis en unos pilares morfológicos y no moleculares, han sido las limitaciones encontradas a la hora de afrontar esta situación.

Sin embargo, el resultado observado en las metástasis locales y a distancia apunta a mecanismos diferentes a los propuestos en el tumor primario. La expresión de FAP fue similar en AdC y MuC, mientras que en SrcC el número de casos FAP+ fue significativamente inferior. Probablemente en este caso juegue algún papel diferencial el origen de los CAFs en las metástasis, tema que será analizado en apartados posteriores.

### **5.3. EXPRESIÓN DE FAP EN LA SECUENCIA TUMOR PRIMARIO-METÁSTASIS Y SU ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE CCR.**

#### **5.3.1. Análisis de FAP en la secuencia tumor primario-metástasis**

Dado que FAP es uno de los marcadores actualmente reconocido de CAFs, células cuya activación parece darse en mayor intensidad en las zonas de interfase tumor-tejido no tumoral de la tumoración primaria (47) (88), nuestro grupo de

trabajo se propuso analizar la expresión de FAP en el centro y borde de infiltración del tumor primario.

El análisis inmunohistoquímico mostró que la expresión de FAP es homogénea a lo largo de la masa neoplásica primaria (centro y borde) en la mayoría de casos que, como se explica en secciones anteriores, fueron tumores pT3 y pT4. Este es un dato a tener en cuenta a la hora de compararlo con el patrón de inmunoexpresión de otros marcadores de CAFs como podoplanina, que tiende a desarrollar un patrón de tinción más heterogéneo (118), y de cara a aplicar terapias emergentes anti-FAP. Se debe tener en cuenta que la mayor parte de CCR diagnosticados en estadio avanzado (estadio IV) no van a ser pacientes quirúrgicos de inicio (119). Para poder predecir la eficacia de diversos fármacos para contener y, en el mejor de los casos, destruir la tumoración es esencial definir de antemano el perfil molecular o inmunohistoquímico de aquellas proteínas y vías carcinogénicas en contra de las que va a ejercer su acción el arsenal terapéutico actual (30). En estos casos, la única muestra neoplásica de la que se va a disponer va a ser la pequeña biopsia diagnóstica obtenida endoscópicamente. Demostrar, por tanto, que FAP se expresa de manera similar en toda la extensión de la tumoración es fundamental para extrapolar los resultados de la biopsia endoscópica a toda la tumoración en estos pacientes. Para ello, va a ser necesario ampliar la comparativa centro/borde de tumor a más casos en estadios pT1-pT2, ya que en estos tumores sí se observó una diferencia en la expresión de FAP, como se explica más abajo.

Por otro lado, ante la ausencia de trabajos previos realizados en metástasis locales y a distancia, quisimos conocer si la expresión de FAP variaba en las metástasis respecto al tumor primario, completando así el estudio de la secuencia evolutiva del CCR.

Destacar en este sentido, que la inmunoexpresión de FAP es mayor en el tumor primario respecto a la metástasis en ganglios linfáticos e hígado. La búsqueda de argumentos que puedan sostener esta realidad no es sencilla, puesto que no se identifican en la literatura trabajos específicos que hayan testado la inmunoexpresión de FAP en metástasis de CCR. No obstante, existen bases experimentales que hablan de dos factores que no sólo incumben a la expresión de FAP por parte de los CAFs, sino también a otros elementos partícipes de la enfermedad oncológica, como son el origen y la heterogeneidad de los mismos (120).

A la vista del patólogo general, los CAFs responden a la clásica imagen de célula fusiforme tumefacta que con sus prolongaciones citoplasmáticas trata de adentrarse entre la celularidad tumoral proliferante. Sin embargo, a día de hoy existe la duda de cuál es el verdadero origen de todos y cada uno de los CAFs presentes en

el medio. Al parecer la fuente principal de CAFs reside en los fibroblastos nativos quiescentes del órgano afectado por la neoplasia (48) y es cierto que, en esencia, todos ellos comparten su función más conocida, remodelar la matriz extracelular. Sin embargo, el modo en que van a realizar dicha función, pero, sobre todo, las señales químicas que van a servir de estímulo para su activación es posible que varíen de unas localizaciones a otras (121). Más aún cuando a esta partida mayoritaria de CAFs derivados de la activación de NAFs nativos se le van a añadir CAFs procedentes de otros compartimentos como la médula ósea o el revestimiento hemangiopericitario de los vasos sanguíneos de la zona (48).

Esto nos permite especular con que el reconocimiento de las diferentes poblaciones de CAFs va a estar sujeto a la expresión de un amplio abanico de proteínas, algunas conocidas, como es el caso de FAP y, otras, aún por explorar. Por lo tanto, el diferente grado de inmunoexpresión de FAP en colon y en sus metástasis puede ser el resultado de que por ejemplo en el hígado la representación de CAFs FAP+ originarios en colon (inmunofenotípicamente similar a los CAFs derivados de los fibroblastos periportales hepáticos) (122) ceda terreno a CAFs derivados de células esteladas perisinusoidales hepáticas sujetos a la expresión de otros marcadores (118) (123).

Pese a esta variedad fenotípica de subpoblaciones de CAFs cada vez cobra más fuerza la idea de que el grueso de ellos comparte vías señalizadoras recíprocas troncales con respecto a la célula tumoral. Concretamente la estimulación de la vía TGF $\beta$  (una de las vías principales impulsoras en la diferenciación de NAFs en CAFs) parece jugar un papel importante a la hora de favorecer el desarrollo de metástasis (124). A su vez se da la situación de que uno de los pilares fundamentales para que la célula tumoral pueda propagarse de manera sistémica es el viraje fenotípico y morfológico que sufre por medio del programa EMT, uno de cuyos impulsores parece ser  $\beta$ -Catenina (60). Entre una vía de señalización (TGF $\beta$ ) y la otra (Wnt /  $\beta$ -Catenina) se han descrito conexiones transversales que les permiten actuar de manera sinérgica (125). Esto hace pensar que, sea cuál sea el inmunofenotipo de CAFs que predomine en la región (tumor primario o metástasis ganglionar) el potencial metastásico en un ambiente rico en CAFs va a estar siempre presente.

La menor expresión de FAP en metástasis en ganglio linfático e hígado, refuerza la idea de que la acción de FAP tiene lugar predominantemente a nivel local, lo que permite afrontar el debate acerca del beneficio o no de terapias anti-FAP desarrolladas en los últimos años. Y es que cobra sentido, por tanto, que pese a que se ha demostrado serológicamente que terapias como Val-boroPro son capaces de inactivar la actividad proteolítica de FAP, no existe franca regresión de la neoplasia

avanzada (90), ya sea porque su actividad no enzimática persiste, ya sea porque el número de CAFs FAP+ sobre el que interactuar es menor.

Interpretando, por tanto, que FAP es una de las herramientas de las que se sirve el tumor primario para infiltrar (frente) y consolidar (centro) su presencia en la neoplasia primaria (88) (89), este estudio ha centrado sus esfuerzos en analizar el valor de FAP en la pared intestinal.

### **5.3.2. Expresión de FAP y su asociación con variables clínicas y patológicas.**

Buena parte de los estudios vinculados a la patología oncológica en general y al CCR en particular tienen como objetivo analizar la influencia de diferentes moléculas conocidas como biomarcadores capaces de aportar información acerca del curso evolutivo de la neoplasia (126). En los últimos años varios grupos de trabajo han focalizado sus estudios en definir la influencia de FAP en tumores epiteliales y no epiteliales, entre ellos el CCR, y los resultados presentados concluyen que la sobreexpresión tisular de FAP en la celularidad estromal, se relaciona con mayor riesgo de desarrollar metástasis locoregionales y a distancia y, en consecuencia, peor supervivencia (86) (89) (106).

Acorde con dichos estudios, otro de los resultados relevantes de esta tesis lo obtuvimos al estratificar los resultados en función de la progresión infiltrativa en el espesor de la pared intestinal (pT). Por un lado, la expresión de FAP en la región intratumoral muestra una progresión creciente significativa a medida que aumenta el grado de infiltración. Este resultado podría indicar mayor grado de activación de CAFs en el centro del tumor primario a medida que este invade la pared intestinal (88).

Por otro lado, cabe destacar que la expresión de FAP en el frente de infiltración de los tumores pT1-2 muestra una tendencia a ser mayor que la de la región intratumoral en los tumores con el mismo grado de invasión local. Sin embargo, en tumores pT3 y pT4 no existen diferencias entre centro y borde. Este dato podría sugerir que el fenómeno de mayor activación de CAFs en las zonas de interfase tumor/tejido no tumoral se da en mayor medida en estadios iniciales (pT1-2), y que cuando el CCR es más infiltrante dicha activación se iguala (47) (88). O bien, que el rol de FAP en los CAFs del borde infiltrante es más relevante que en el centro hasta que el tumor alcanza la muscular propia. Futuros estudios en tumores menos infiltrantes nos permitirán corroborar este resultado.

La expresión de FAP en centro y borde de la tumoración respecto al estadio de la enfermedad no arrojó resultados estadísticamente significativos. Es cierto que

sí se aprecia una tendencia creciente en la expresión de FAP en ambas regiones del tumor primario paralela al incremento del estadio. Sin embargo, nuestra serie no pudo reproducir los resultados de Henry y col. y Wikberg y col. (88) (89) a nivel de tumor primario y, pese a que podía intuirse cierta tendencia creciente entre la expresión de FAP en centro/borde y estadio, la falta de significancia estadística no le permite asignar a esta proteína un papel predictor de la evolución de la enfermedad.

Es muy probable que el diseño de la muestra a estudio no sea el más adecuado para analizar esta realidad, dado que el 89% de los casos fueron diagnosticados en estadio avanzado (III o IV). Y es que ante el planteamiento inicial de completar el estudio de la enfermedad en fase avanzada se optó por incluir pacientes de estas características. Esta decisión nos ha dado la oportunidad de contar con muestras cuyo seguimiento evolutivo desde el diagnóstico hasta el fallecimiento ha sido completo. No obstante, las dificultades ético-legales a la hora de reclutar nuevos casos en estadio inicial han dificultado dar significación estadística a las tendencias apreciadas.

### **5.3.3. FAP y el programa EMT**

Una de las funciones atribuidas a los CAFs es la de facilitar la desdiferenciación de la célula epitelial neoplásica proliferante en el recientemente mencionado programa EMT (58). Este proceso, cuya repercusión pronóstica parece haber alcanzado su máxima expresión en estadios precoces de CCR (estadios I y II) es hoy en día una realidad en los informes de patología de resecciones locales y piezas de resección de intestino grueso (64).

Con intención de abordar un estudio coste-efectivo se realizó el conteo de PDCs siguiendo las pautas establecidas por Ueno y cols (31), que evidenció un salto cuantitativo destacado, aunque no estadísticamente significativo, en el número de PDC entre los estadios localizados y avanzados. Esta progresión indicó que desde los estadios localizados al estadio III existía un incremento en el número de casos que mostraban entre 5 y 9 PDCs respecto a los que únicamente mostraban 4 o menos PDCs.

Estos resultados, a lo mejor con mayor significación en caso de haber subestratificado el conteo de PDCs (actualmente no reconocido a nivel bibliográfico), pueden ser reflejo de dos mensajes: en primer lugar, el conteo de PDCs se aproxima bastante a los resultados que cabría esperar en el conteo de *budding* tumoral (102), parámetro de análisis del EMT por excelencia (64); en segundo lugar, que existan islotes pobremente diferenciados puede significar que existe celularidad neoplásica



enmascarada bajo el manto fibroblástico que permea con mayor facilidad vasos linfáticos y sanguíneos para favorecer así la diseminación tumoral a distancia, tal y como ocurre en la transición entre los estadios I-II y III (127).

A la hora de vincular PDCs y FAP+, el estudio no arrojó resultados estadísticamente significativos pese a que se apreció una expresión destacada de FAP en cada uno de los niveles de PDC. Es posible que una de las limitaciones a la hora de evaluar la asociación entre estos dos parámetros haya sido la dificultad de incorporar en los cores para la inmunotinción con FAP los islotes de PDCs. Además, no se debe olvidar la heterogeneidad de marcadores de CAFs que pueden estar implicados en el programa EMT (128). De hecho, tal y como se ha descrito en trabajos recientes, otros marcadores de CAFs como S100A4 sí han arrojado resultados estadísticamente significativos (118).

La descripción de los diferentes tipos de estroma en el frente de infiltración tumoral, según la cual a mayor nivel de infiltración parietal existía mayor tendencia a desarrollar un estroma queloideo, puede ser consecuencia de la remodelación de la matriz extracelular colagénica llevada a cabo por los CAFs en su intento de allanar el camino a las células epiteliales proliferantes en su recorrido infiltrante. La homogeneidad de la expresión de FAP en los diferentes tipos de estroma, no obstante, invita a pensar en que FAP no es la única peptidasa involucrada en dicha remodelación. Resulta curioso pensar que un estroma compuesto por gruesos haces de colágeno compactos, como es el caso del estroma queloideo predominante en CCR con afectación transmural, pueda favorecer el avance de la celularidad tumoral a través de su espesor. Y es que, aparentemente, una matriz conectiva laxa (estroma mixoide) parece más favorable a posibilitar la migración celular. Sin embargo, si la remodelación estromal se concibe como un proceso continuo de lisis, organización, compactación de haces colagénicos y combinación de mucopolisacáridos, puede llegar a comprenderse que la compresión ejercida por el estroma en su punto álgido de compactación sea la causa de la ruptura de nidos de células neoplásicas que se disgregan en su empeño de colonizar la pared intestinal y estructuras a distancia (129).

#### **5.4 ANÁLISIS DE FAP Y OTROS MARCADORES DE MICROAMBIENTE TUMORAL.**

El desarrollo de tumores es un proceso dinámico que engloba una masa de células metabólicamente inestable en continua transformación. Esa plasticidad es en gran parte producto de un conjunto de señales e interacciones que parten de células que constituyen lo que hoy en día se conoce como microambiente tumoral (130).

El trabajo que presentamos ha tratado de reflejar la relación de una proteína (FAP) expresada por uno de los componentes mayoritarios de este microambiente (CAF) respecto al conjunto de la tumoración y su evolución en el tiempo. En este sentido, parece que FAP puede jugar un papel protumoral en el desarrollo del tumor primario y, de forma significativa, a nivel del centro del tumor. La expresión de FAP, sin embargo, no parece pronosticar, por sí sola, el devenir de la enfermedad, a diferencia de lo que han descrito otros grupos de trabajo (88) (89).

Los resultados expuestos y discutidos en apartados anteriores sugieren que FAP es una proteína que desempeña su acción a nivel local y desde los momentos iniciales del desarrollo de la masa tumoral. Sin embargo, este estudio pretende ampliar el rango de acción de FAP y concretar cuál puede ser su valor pronóstico en asociación con marcadores cuya expresión parece estar modulada por CAFs. Estas proteínas analizadas están firmemente vinculadas a los fenómenos de EMT (E-cadherina,  $\beta$ -Catenina y vimentina), al mantenimiento del fenotipo de célula madre (CD44) y a la proliferación e inmortalidad celular (ciclina D1) (54) (62) (63).

Entre las combinaciones anteriormente mencionadas el estudio inmunohistoquímico aporta resultados de gran interés a la hora de vincular FAP y  $\beta$ -Catenina. Y es que FAP+ y la expresión nuclear de  $\beta$ -Catenina en el frente de infiltración tumoral y ganglio linfático predicen y se comportan como factores pronóstico independientes de peor supervivencia cáncer-específica y tiempo libre de enfermedad (CSS y DFS).

$\beta$ -Catenina es una proteína de localización intracitoplasmática cuya disposición en grandes complejos proteicos adheridos a E-cadherina permite mantener la cohesión celular. Como participante en la vía de señalización Wnt, la viabilidad y, por tanto, funcionalidad de esta proteína está sujeta al menor o mayor grado de degradación por parte de las proteínas del complejo APC. Y es que una activación de Wnt en la superficie celular impide la degradación de  $\beta$ -Catenina, cuyo excedente será dirigido al núcleo citológico para actuar como factor de transcripción de genes involucrados en la proliferación, diferenciación y mantenimiento del fenotipo de células madre (131).

En condiciones fisiológicas se requiere de un equilibrio en la activación de Wnt y la degradación proteica de  $\beta$ -Catenina que posibilite entre otros la migración celular durante el desarrollo embrionario (63). Precisamente de la alteración de ese equilibrio se sirven varios procesos neoplásicos, entre ellos el CCR, para propiciar un estado de hiperactivación continua causante del acúmulo nuclear de  $\beta$ -Catenina y consecuente transcripción de genes que dotan a la célula de rasgos de inmortalidad y dediferenciación (131).

La forma por la que los fibroblastos FAP+ son capaces de interactuar con las células tumorales para inducir en ellas la activación de la vía Wnt/  $\beta$ -Catenina aún hoy en día no se conoce con certeza. Estudios muy recientes apuntan a que la sobreexpresión de la proteína Dickkopf-3 (DDK3) en CAFs estimularía la activación de Wnt a través de su vía canónica en el propio fibroblasto (132). Sería necesario, no obstante, definir mediadores (exosomas, por ejemplo) capaces de transferir dicha señalización activadora al receptor Wnt en la membrana citoplasmática de la célula tumoral proliferante (133).

Tanto FAP, en fibroblastos, como  $\beta$ -Catenina, en la célula tumoral, se sobreexpresan ya desde el momento en que la displasia intraepitelial se torna infiltrante (134). En esa fase precoz e incluso cuando el frente de infiltración alcanza estratos más profundos llama la atención en nuestra serie, contrario a lo que se ha expuesto en trabajos previos (135), que no exista un vínculo que asocie la sobreexpresión de FAP y  $\beta$ -Catenina con la disminución de la expresión de E-cadherina. Esto sugiere que la transformación desde célula epitelial tumoral hasta célula mesenquimatosa con capacidad migratoria no se deba en buena parte de los casos a la hiperactivación de la vía Wnt por FAP sino más bien a la mutación y consiguiente pérdida de función de APC que da inicio a la vía carcinogénica en la mayor parte de CCR o a otro tipo de mutaciones como las descritas en la vía de EGFR (136). Parece, por tanto, que la participación de FAP en el proceso de desdiferenciación celular podría quedar en un segundo plano. Este hallazgo podría ayudarnos a entender lo descrito en párrafos anteriores, según lo cual, no se apreció correlación entre FAP y la cuantificación de PDCs.

Este solapamiento de diferentes vías mutacionales es precisamente el que mejor puede explicar a día de hoy los motivos por los que no se aprecia un vínculo que relacione exclusivamente FAP y CD44 o FAP y Ciclina D1. Y es que tanto CD44 como Ciclina no sólo pueden sobreexpresarse a través de la vía Wnt /  $\beta$ -Catenina. Vías y factores transcripcionales alternativos como p53, ERK y Notch han demostrado incentivar el desarrollo de fenotipo de célula madre y la proliferación celular (96) (137).

El desarrollo del CCR es, por tanto, una continua superposición de vías de señalización entre las células tumorales y su ambiente (138). Una de esas interacciones parece vincular de manera firme a FAP con  $\beta$ -Catenina hasta tal punto que la expresión de FAP en el citoplasma de fibroblastos y  $\beta$ -Catenina en el núcleo de las células tumorales del frente de infiltración y ganglio linfático es capaz de predecir un peor pronóstico de la enfermedad. Sería necesario ahondar en nuevos estudios dirigidos a concretar el punto de conexión entre estas dos proteínas y su

asociación con la agresividad tumoral.

### **5.5 ANÁLISIS DE FAP SOLUBLE EN PLASMA DE PACIENTES CON CCR.**

El incremento en la incidencia de las enfermedades oncológicas en las últimas décadas ha ido ligado al estudio de nuevas vías diagnósticas y terapéuticas encaminadas a detectarlas y erradicarlas de forma precoz. De los más de dieciocho millones de personas que se estima han sido diagnosticadas de cáncer en el año 2018 a nivel mundial (139), algunos fallecerán y otros muchos continuarán viviendo siempre bajo una situación expectante que les aconsejará someterse a controles periódicos (140).

La monitorización de estas enfermedades es posible realizarla a través de métodos no invasivos fundamentados en el estudio de diferentes sustancias (la mayor parte de ellas proteínas) liberadas al torrente sanguíneo por células tumorales o no tumorales. La cuantificación de estas proteínas o biomarcadores (frecuentemente referidos como marcadores tumorales) es, por tanto, una práctica habitual en los centros hospitalarios a nivel mundial (141).

Uno de los biomarcadores empleados en clínica que ha sido y aún es objeto de estudio en el CCR es el Antígeno Carcinoembrionario o CEA. Los valores prequirúrgicos elevados por encima de 5ng/mL son indicativos de un pronóstico desfavorable de la enfermedad ya que una elevación de dichos valores durante la fase libre de enfermedad puede ser indicativos de recurrencia a nivel hepático (142).

Recientemente se ha descubierto que FAP no sólo se encuentra asociada a la membrana plasmática de las células, sino que también dispone de una fracción soluble en sangre periférica (69) (143). Haber podido contar con plasma de pacientes de CCR ha posibilitado analizar el valor de FAP soluble (FAPs) y ha supuesto, por tanto, una oportunidad para evaluar de forma completa el papel de FAP en el CCR.

Según lo descrito previamente (89) (106) y lo observado en nuestro estudio, FAP no se expresa en la mucosa intestinal normal y sí en el CCR, y además su expresión aumenta a medida que la neoplasia se hace más infiltrante. De este resultado en el tejido tumoral podría deducirse que los niveles de FAPs en el plasma deberían incrementarse en pacientes con CCR respecto a sujetos sanos. Pero el argumento según el cual el peso de la secreción de FAPs recae únicamente sobre el tumor, resulta poco consistente ya que no partimos de la ausencia total de FAPs en el torrente sanguíneo, tal y como hemos podido comprobar al analizar el plasma de individuos sanos. La presencia de niveles basales de FAPs en el plasma ha sido descrita en varios estudios y se ha sugerido un origen diverso, como el hígado, el tejido adiposo y el sistema inmune (144). Teniendo en cuenta que en el cáncer el

organismo sufre cambios más allá del órgano donde crece el tumor, sería esperable que estos cambios afecten de algún modo a la FAPs y que, por lo tanto, el origen de sus alteraciones a nivel plasmático no se limite al tumor.

En el estudio de Javidroozi y cols. (74) se observó que los niveles de FAPs descendían respecto a los niveles basales en sujetos control, algo que hemos podido corroborar en nuestro estudio. Pero, además, en esta tesis demostramos que existe una relación inversa con el tamaño tumoral y que los niveles bajos de FAPs (por debajo de 30ng/mL) se asocian de forma independiente con una peor supervivencia de los pacientes con CCR.

Una de las hipótesis para explicar este fenómeno sugiere que lo observado con la FAPs vendría a ser similar a lo que ocurre con algunos reactantes de fase aguda en procesos inflamatorios (como la transferrina y albúmina), cuyos niveles plasmáticos también bajan (145). Por otro lado, existen trabajos que describen a la FAPs como un factor que tiene como sustrato a la  $\alpha$ -2-antiplasmina (146) (147), enzima responsable de la estabilización del coágulo de fibrina a través de la rápida inhibición de plasmina en el mismo (74). La catalización de dicha enzima por parte de la actividad endopeptidasa de FAP, lejos de inhibir su acción antifibrinolítica, la potencia aún más (76). Por lo tanto, podría inferirse que una disminución de los niveles de FAPs podría indirectamente favorecer una situación antitrombótica o cuanto menos atenuar la función antifibrinolítica de  $\alpha$ -2-antiplasmina (148).

El CCR, al igual que otro tipo de neoplasias, expone al individuo que lo padece a una situación de hipercoagulabilidad propensa al desarrollo de trombosis vasculares (149) que, ya en 1.977, el equipo de trabajo del departamento de cirugía de la Universidad de Arizona vinculó con la migración a distancia de las células tumorales (150). En este sentido y, dado que una buena parte de la producción de FAPs parece tener lugar de manera fisiológica por parte de nuestro organismo (75), cabría pensar que el descenso de los niveles de FAPs en el CCR constituiría una respuesta protectora del organismo dirigida a evitar un estado protrombótico. Un ejemplo de trabajo que contrasta esta hipótesis es el desarrollado por Uitte De Willige y colaboradores en los que se afirma que los niveles de FAPs decrecen en las fases inmediatamente posteriores a un evento arterial trombótico (146).

Estudios realizados por el grupo donde se enmarca esta tesis han demostrado que también otras peptidasas muestran niveles de expresión muy divergentes en el tejido tumoral y plasma de pacientes con CCR (151) (152) (153). Por ejemplo, los altos niveles plasmáticos de la dipeptidil-peptidasa IV/CD26 (DPPIV/CD26), serina peptidasa homóloga de la FAP, son un factor pronóstico independiente para una peor supervivencia de los pacientes con CCR (151). Sin embargo, en el tejido no hay

diferencias sustanciales que asocien expresión inmunohistoquímica de esta peptidasa y pronóstico. La baja actividad de la aminopeptidasa N/CD13 (APN/CD13) en el tejido, pero alta en el plasma es también un factor pronóstico independiente de peor supervivencia (153). Además, en ambos casos los niveles en el plasma de sujetos control fueron parecidos o superiores a los pacientes con CCR. Nuestra hipótesis apoya la idea de la participación de diferentes órganos y tejidos, además del propio tumor, en los cambios observados en los niveles plasmáticos de las peptidasas (74).

En conclusión, al igual que lo observado en estudios previos con otras peptidasas (151) (153), la determinación de niveles de FAPs se presenta como un potencial biomarcador plasmático de CCR. Sus diferentes fuentes de producción y dinamismo en el proceso carcinogénico obligan, sin embargo, a dar continuidad a este estudio. Para ello son necesarios nuevos trabajos que sean capaces de explicar cuál es el mecanismo concreto por el que el descenso significativo de los niveles de FAPs implica un futuro oscuro en la evolución del CCR.

## **5.6 PERSPECTIVAS DE FUTURO Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS**

La expresión inmunohistoquímica de FAP en hasta un 70% de CCR primarios supone un paso más en la búsqueda de herramientas encaminadas a realizar un diagnóstico coste-efectivo y psicológicamente menos traumático para el paciente. Pequeños estudios corroboran la experiencia de este grupo en la práctica asistencial diaria en el diagnóstico de biopsias endoscópicas, según la cual hasta un 20% de pacientes con lesión primaria endoscópica y radiológicamente visible requieren de la repetición del procedimiento endoscópico que aporte una histología positiva (154). La expresión de FAP constituye un apoyo más en favor del diagnóstico de una lesión invasiva en aquellos casos en los que la superficialidad de la muestra, aunque morfológicamente lo sugiera, no permite confirmarlo. Claro está que existe un espectro de aproximadamente un 10% de casos de displasia intraepitelial de alto grado que, tal y como se sugería en capítulos anteriores, requieren de un estudio adicional que valore la expresión de FAP.

Que la asociación de un perfil estromal FAP + / celularidad epitelial tumoral  $\beta$ -Catenina nuclear adquiera valor pronóstico negativo es sinónimo del refuerzo que supone para la expresión de FAP la activación de la vía Wnt /  $\beta$ -Catenina en la evolución del CCR. Se abren así nuevos horizontes terapéuticos que pudieran interrumpir dicho vínculo. Sin embargo, como se ha sugerido en párrafos anteriores, la activación de esta vía no es, ni mucho menos, exclusiva de FAP. Así como dianas dirigidas a obstaculizar la falta de degradación de  $\beta$ -Catenina por mutaciones en APC están en proceso, existe la duda de que terapias dirigidas exclusivamente contra FAP

puedan llegar a resultar efectivas (90). Más aún, no se puede olvidar que la activación de Wnt /  $\beta$ -Catenina a través de la vía canónica es en esencia un proceso fisiológico de cuyo desarrollo depende el normal funcionamiento de diferentes tejidos (152) (155).

Las expectativas futuras pasan, por tanto, por considerar los valores de FAPs como potenciales notificadores del estado de la enfermedad en los pacientes de Adc. La detección precoz del CCR, los avances en la práctica quirúrgica y el desarrollo de nuevos arsenales médicos posibilitan hoy en día prolongar la supervivencia de algunos de estos pacientes pero no, sin embargo, disminuir la mortalidad (139) (140). Cuantificar y definir límites en los valores de FAPs puede aportar de manera no invasiva información esencial acerca de la evolución de la enfermedad.

## 6. CONCLUSIONES

1. La expresión de FAP en el estroma puede ser indicativo de infiltración mural. La ausencia de expresión en adenomas de bajo grado y su expresión en muchos CCR así lo sugieren.
2. La expresión de FAP es mayor en AdC que en MuC y SrcC.
3. La expresión de FAP es mayor en el tumor primario que en las metástasis y parece jugar un papel determinante en las primeras fases del crecimiento mural. Su expresión, sin embargo, no puede ser utilizada como un parámetro predictivo de metástasis y supervivencia.
4. La expresión conjunta de FAP y  $\beta$ -Catenina nuclear en el frente de infiltración tumoral y en metástasis ganglionar locorregional predicen metástasis a distancia y peor supervivencia cáncer-específica y libre de enfermedad.
5. Los pacientes con AdC presentan niveles inferiores de FAPs respecto a los sujetos sanos. Además, cuanto más bajos son los niveles de FAPs, la invasión de vasos linfáticos es mayor y la supervivencia es peor (niveles inferiores a 30ng/mL. La determinación de niveles en plasma de FAPs podría, por tanto, considerarse un potencial biomarcador diagnóstico y pronóstico en CCR.



# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pawlina W, Ross M. Histología Texto y Atlas. Correlación con biología celular y molecular. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina: Panamericana, 2007.
2. Adler DG, Farraye FA, Crawford JM. Chapter 1-Gastrointestinal Tract Endoscopic and Tissue Processing Techniques and Normal Histology Methods for Obtaining. En: J.R. Goldblum, R.D. Odze. Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. Third Edit. Philadelphia, Estados Unidos: Saunders-Elsevier; 2015. 4-33.
3. Kakar S, Shi C, Berho M, Driman D, Fitzgibbons P, Frankel W, et al. Estados Unidos: College of American Pathologists; 2017. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. [www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates](http://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates).
4. Cui D, Naftel JP, Lynch JC, Yang G, Daley WP, Haines DE, et al. Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations. First Edit. Baltimore, Estados Unidos: Lippinot Williams and Wilkins; 2011.
5. Young B, O´Dowd G, Woodford P. Aparato Gastrointestinal. En: Young B, O´Dowd G, Woodford P. Wheater Histología Funcional. Texto y atlas en color. 6ª Ed.: Elsevier; 2014. 251-75.
6. Thiagarajah JR, Verkman AS. Water Transport in the Gastrointestinal Tract chapter 55. En: Said HM. Physiology of the Gastrointestinal Tract 6th Ed. Estados Unidos: Elsevier; 2018. 1249-72.

7. Kierszenbaum AL, Tres LL. Lower Digestive Segment chapter 16. En: Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 5th Ed. Philadelphia, Estados Unidos: Saunders; 2016. 543-74.
8. World Health Organization, Globocan. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. 2018. <http://globocan.iarc.fr/>.
9. Redston M, Driman DK. Chapter 27–Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. En: Goldblum JR, Odze RD. Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. Third Edit. Philadelphia, Estados Unidos: Saunders-Elsevier; 2015. págs. 737-778.
10. Departamento de Salud Gobierno Vasco. Incidencia del cáncer en la Comunidad Autónoma de Euskadi en 2014. País Vasco, España: López de Munain A; 2018. [http://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/registros\\_cancer/es\\_def/adjuntos/informe-cancer-2014.pdf](http://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/registros_cancer/es_def/adjuntos/informe-cancer-2014.pdf).
11. Nagtegaal ID, Arends MJ, Odze RD, Lam AK. Tumours of the colon and rectum. En: WHO Classification of Tumours of the Digestive System 5th Edition. Lyon, Francia: WHO Classification of Tumours Editorial Board; 2019. 159-92.
12. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. Lancet. 2010; 375 (9719): 1030-47. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60353-4.
13. Turner JR, Lingen MW. Capítulo 15-Cavidad Oral y Tubo Digestivo. En: Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins Patología Humana 10ª Edición. Barcelona, España: Elsevier; 2018. 583-636.
14. LeGolván M, Taliano RJ, Resnick MB. Application of molecular techniques in the diagnosis, prognosis and management of patients with colorectal cancer: a practical approach. Hum Pathol. 2012; 43 (8): 1157-68. doi: 10.3748/wjg.v20.i14.3847.

15. Jover R, Payá A. Inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal: concepto, métodos de detección y utilidad clínica. *Gastroenterol Hepatol*. 2003; 26 (10): 656-63.
16. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. 2013, *Histopathology*. 2013; 62 (3): 367–86. doi: 10.1111/his.12055.
17. Zhu F, Pan D, Zhang H, Ye Q, Xu P, Pan J. Single-center study of Lynch syndrome screening in colorectal polyps. *Hered Cancer Clin Pract*. 2019; 17 (9): 1-5. doi:10.1186/s13053-019-0108-6.
18. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung J, Boelens PG, et al. Colorectal Cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1:15065. doi:10.1038/nrdp.2015.65.
19. Payá Romá A, Alenda González C, Jover Martínez R, Aranda López FI. Carcinoma colorrectal con alteración de la vía reparadora. Claves para su identificación y relevancia clínica. *Revista Española de Patología*. 2006; 39 (4): 201-8.
20. Chu E. Neoplasms of small and large intestine. En: Schafer A, Goldman L. *Goldman-Cecil. Medicine*. 26th Ed. Estados Unidos: Elsevier; 2019. 1294-1304.
21. Centro Coordinador del Programa de Cribado Subdirección de Asistencia Sanitaria-Dirección General de Osakidetza. Programa de Cribado de Cáncer Colorrectal en Euskadi. País vasco, España: Portillo I; 2017. [http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/deteccion\\_cancer\\_colorrectal/es\\_def/adjuntos/PROGRAMA2017\\_v1.pdf](http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/deteccion_cancer_colorrectal/es_def/adjuntos/PROGRAMA2017_v1.pdf).
22. Jessup JM, Goldberg RM, Asare EA, Benson AB, Brierley JD, Chang GJ et al. Chapter 20-Colon and Rectum. En: M.B.Amin et al. *AJCC Cancer Staging Manual 8th Ed*. Estados Unidos: Springer; 2017.

23. Kang S, Na Y, Yup S, Lee S, Oh S, Min B. The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97 (9): e0019. doi: 10.1097/MD.00000000000010019.
24. Battaglin F, Naseem M, Lenz HJ, Salem M. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Overview of Its Clinical Significance and Novel Perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018; 16 (11): 735-45.
25. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, HS et al. Prognostic Factors in Colorectal Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124 (7): 979-94.
26. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Colorectal Cancer. *Arch Surg*. 2012; 147 (4): 366-72. doi: 10.1001/archsurg.2012.35.
27. Jass J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50 (1): 113-30.
28. Koelzer V, Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator. *Front Oncol*. 2014; 4: 29. doi: 10.3389/fonc.2014.00029
29. Wolpin B, Mayer RJ. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2008; 134 (5): 1296-310. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.098.
30. Sepulveda A, Hamilton SR, Allegra CJ et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2017; 1; 35 (13): 1453-86. doi: 10.1200/JCO.2016.71.9807.

31. Ueno H, Shinto E, Kajiwara Y, Fukazawa S, Shimazaki H, Yamamoto J, Hase K. Prognostic impact of histological categorisation of epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014; 111 (11): 2082-90. doi: 10.1038/bjc.2014.509.
32. López JI, De Petris G. Discovering intratumor heterogeneity: the next frontier for pathologists. *Pathologica*. 2017; 109 (2): 110-113.
33. Blank A, Roberts DE, Dawson H, Zlobec I, Lugli A. Tumor heterogeneity in Primary Colorectal Cancer and Corresponding Metastases. Does the Apple Fall Far From the Tree? *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5:234. doi: 10.3389/fmed.2018.00234.
34. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21 (3): 309-22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
35. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
36. Wanga W, Kandimallab R, Huangc H, Zhuc L, Lia Y, Gaoc F, et al. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Semin Cancer Biol*. 2019; 55: 37-52. doi: 10.1016/j.semancer.2018.05.002.
37. Thanki k, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C, et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *Int Biol Biomed J*. 2017; 3 (3): 105-111.
38. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013; 19 (11): 1423-37. doi: 10.1038/nm.3394.

39. DeClerck YA, Fang H. Targeting the Tumor Microenvironment: From Understanding Pathways to Effective Clinical Trials. *Cancer Res.* 2013; 73 (16): 4965-77. doi: 10.1158/0008-5472.
40. Tres L, Kierszenbaum AL. Cardiovascular System chapter 12- Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 5th Ed. Philadelphia, Estados Unidos: Saunders; 2016. 421-46.
41. Colangelo T, Polcaro G, Muccillo L, D'Agostino G, Rosato V, Ziccardi P, et al. Friend or foe? The tumour microenvironment dilemma in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017; 1867 (1): 1-18. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.11.001.
42. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015; 368 (1): 7-13. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.039.
43. Passardi A, Canale M, Valgiusti M, Ulivi P. Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (6): 1324-36. doi: 10.3390/ijms18061324.
44. Buchbinder E, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016; 39 (1): 98-106. doi: 10.1097/COC.0000000000000239.
45. Sansom D. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology.* 2000 Oct;101(2):169-77.
46. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* 2014; 211 (8): 1503-23. doi: 10.1084/jem.20140692.
47. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16 (9): 582-98. doi: 10.1038/nrc.2016.73.

48. LeBleu V, Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origin, functions and translational impact. *Dis Model Mech.* 2018; 11 (4). pii: dmm029447. doi: 10.1242/dmm.029447.

49. Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 2004; 6 (1): 17-32.

50. Lipson k, Wong C, Teng Y, Spong Z. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012; 5 (Suppl 1): S24. doi: 10.1186/1755-1536-5-S1-S24.

51. Jedeszko C, Victor BC, Podgorski I, Sloane BF. Fibroblast Hepatocyte Growth Factor Promotes Invasion of Human Mammary Ductal Carcinoma in Situ. *Cancer Res.* 2009; 69 (23): 9148-55. doi: 10.1158/0008-5472.

52. Schatoff E, Leach BI, Dow LE. WNT Signaling and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2017; 13 (2): 101-110. doi: 10.1007/s11888-017-0354-9.

53. Ochoa-Hernández AB, Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA, Barros-Núñez P. La vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina y su relación con cáncer. *Cir Cir.* 2012; 80 (4) 389-98.

54. Hong I, Hong SW, Chang YG, Lee WY, Lee B, Kang YK, et al. Expression of the Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Colorectal Cancer: An Immunohistochemical Staining Analysis. *Ann Coloproctol.* 2015; 31 (3): 84-91. doi: 10.3393/ac.2015.31.3.84.

55. Pitule P, Cedikova M, Daum O, Vojtisek J, Vycital O, Hosek P, et al. Immunohistochemical Detection of Cancer Stem Cell Related Markers CD44 and CD133 in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 432139. doi: 10.1155/2014/432139

56. Ziani L, Chouaib S, Thiery J. Alteration of the Antitumor immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. *Front Immunol.* 2018; 9: 414. doi: 10.3389/fimmu.2018.00414.
57. Ueno H, Jones A, Jass JR, Talbot IC. Clinicopathological significance of the 'keloid-like' collagen and myxoid stroma in advanced rectal cancer. *Histopathology.* 2002; 40 (4): 327-34.
58. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119 (6): 1420-8. doi: 10.1172/JCI39104.
59. Roche J. The Epithelial to Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel).* 2018; 10 (2). pii: E52. doi: 10.3390/cancers10020052.
60. Gurzu S, Silveanu C, Fetyko A, Butiurca V, Kovacs Z, Jung I. Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016; 22 (30): 6764-75. doi: 10.3748/wjg.v22.i30.6764.
61. Gurzu S, Turdean S, Kovacs A, Contac AO, Jung I. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update. *World J Clin Cases.* 2015; 3 (5): 393-404. doi: 10.12998/wjcc.v3.i5.393
62. Wen W, Ding J, Sun W, Fu J, Chen Y, Wu K, et al. Cyclin G1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition via Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling Facilitates Liver Cancer Progression. *Hepatology.* 2012; 55 (6): 1787-98. doi: 10.1002/hep.25596.
63. Zeisberg M, and Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009; 119 (6): 1429-37. doi: 10.1172/JCI36183.



64. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas C, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017; 30 (9):1299-1311. doi: 10.1038/modpathol.2017.46.
65. Paulsso J, Micke P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin Cancer Biol.* 2014; 25: 61-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.02.006.
66. López JI, Errarte P, Erramuzpe A, Guarch R, Cortés JM, Angulo JC, et al. Fibroblast activation protein predicts prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2016; 54: 100-5. doi: 10.1016/j.humpath.2016.03.009.
67. Errarte P, Guarch R, Pulido R, Blanco L, Nunes- Xavier CE, Beitia M, et al. The Expression of Fibroblast Activation Protein in Clear Cell Renal Cell Carcinomas Is Associated with Synchronous Lymph Node Metastases. *PLoS One.* 2016; 11 (12): e0169105. doi: 10.1371/journal.pone.0169105.
68. Page MJ, Di Cera E. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65 (7-8): 1220-36. doi: 10.1007/s00018-008-7565-9.
69. Liu R, Li H, Liu L, Yu J, Ren X. Fibroblast activation protein: A potential therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13 (3): 123-9. doi: 10.4161/cbt.13.3.18696.
70. Zi F, He J, He D, Li Y, Yang L, Cai Z. Fibroblast activation protein  $\alpha$  in tumor microenvironment: Recent progression and implications (Review). *Mol Med Rep.* 2015; 11 (5): 3203-11. doi: 10.3892/mmr.2015.3197.
71. Puré E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics. *Oncogene.* 2018; 37 (32): 4343-4357. doi: 10.1038/s41388-018-0275-3.

72. Liao Y, Xing S, Xu B, Liu W, Zhang G. Evaluation of the circulating level of fibroblast activation protein  $\alpha$  for diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017; 8 (18): 30050-30062. doi: 10.18632/oncotarget.16274.

73. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee P. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood*. 2006; 107 (4): 1397-404.

74. Javidroozi M, Zucker S, Chen WT. Plasma Seprase and DPP4 Levels as Markers of Disease and Prognosis in Cancer. *Dis Markers*. 2012; 32 (5): 309-20. doi: 10.3233/DMA-2011-0889.

75. Kelly T, Huang Y, Simms AE, Mazur A. Fibroblast Activation Protein- $\alpha$ : A key Modulator of the Microenvironment in Multiple Pathologies. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012; 297: 83-116. doi: 10.1016/B978-0-12-394308-8.00003-0.

76. Hamson E, Keane FM, Tholen S, Schilling O, Gorrell MD. Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics Clin Appl*. 2014; 8 (5-6): 454-63. doi: 10.1002/prca.201300095.

77. Christiansen VJ, Jackson KW, Lee KN, Downs TD, McKee PA. Targeting Inhibition of Fibroblast Activation Protein- $\alpha$  and Prolyl Oligopeptidase Activities on Cells Common to Metastatic Tumor Microenvironments. *Neoplasia*. 2013; 15 (4): 348-58.

78. Fan MH, Zhu Q, Li HH, Ra HJ, Majumdar S, Gulick DL, et al. Fibroblast Activation Protein (FAP) Accelerates Collagen Degradation and Clearance from Lungs in Mice. *J Biol Chem*. 2016; 291 (15): 8070-89. doi: 10.1074/jbc.M115.701433.

79. Jia J, Martin TA, Ye L, Meng L, Xia N, Wen G, et al. Fibroblast activation protein- $\alpha$  promotes the growth and migration of lung cancer cells via the PI3K and sonic hedgehog pathways. *Int J Mol Med*. 2018; 41 (1): 275-283. doi: 10.3892/ijmm.2017.3224.

80. Turk B, Turk D, Turk V. Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J.* 2012; 31 (7): 1630-43. doi: 10.1038/emboj.2012.42.
81. Yang X, Lin Y, Shi Y, Li B, Liu W, Yin W et al. FAP promotes Immunosuppression by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment via STAT-CCL2 Signaling. *Cancer Res.* 2016; 76 (14): 4124-35. doi: 10.1158/0008-5472.
82. Zboralski D, Hoehlig K, Eulberg D, Frömming A, Vater A. Increasing tumor-infiltrating T cells through inhibition of CXCL12 with NOX-A12 synergizes with PD-1 blockade. *Cancer Immunol Res.* 2017; 5 (11): 950-956. doi: 10.1158/2326-6066.
83. Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells R, Deonarineb A, Chan DS, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110 (50): 20212-7. doi: 10.1073/pnas.1320318110.
84. Baird SK, Allan L, Renner C, Scott FE, Scott AM. Fibroblast activation protein increases metastatic potential of fibrosarcoma line HT1080 through upregulation of integrin-mediated signaling pathways. *Clin Exp Metastasis.* 2015; 32 (5): 507-16. doi: 10.1007/s10585-015-9723-4.
85. Wang H, Wu Q, Liu Z, Luo X, Fan Y, Liu Y et al. Downregulation of FAP suppresses cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1155. doi: 10.1038/cddis.2014.122.
86. Liu F, Qi L, Liu B, Liu J, Zhang H, Che D et al. Fibroblast Activation Protein Overexpression and Clinical Implications in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015; 10 (3): e0116683. doi: 10.1371/journal.pone.0116683.

87. Iwasa S, Jin X, Okada K, Mitsumata M, Ooi A. Increase expression of seprasa, a membrane-type serine protease, is associated with lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2003; 199 (1): 91-8.

88. Wikberg ML, Edin S, Lundberg IV, Van Guelpen B, Dahlin AM, Rutegard J, et al. High intratumoral expression of fibroblast activation protein (FAP) in colon cancer is associated with poorer patient prognosis. *Tumour Biol.* 2013; 34 (2): 1013-20. doi: 10.1007/s13277-012-0638-2.

89. Henry LR, Lee HO, Lee JS, Klein-Szanto A, Watts P, Ross EA, et al. Clinical Implications of Fibroblast Activation Protein in Patients with Colon Cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (6): 1736-41

90. Narra K, Mullins SR, Lee HO, Strzemkowski-Brun B, Magalong K, Christiansen VJ, et al. Phase II Trial of Single Agent Val-boroPro (Talabostat) Inhibiting Fibroblast Activation Protein in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6 (11): 1691-9.

91. Jiang GM, Xu W, Du J, Zhang KS, Zhang QG, Wang XW, et al. The application of the fibroblast activation protein  $\alpha$ -targeted immunotherapy strategy. *Oncotarget.* 2016; 7 (22): 33472-82. doi: 10.18632/oncotarget.8098.

92. Wen Y, Wang CT, Ma TT, Li ZY, Zhou LN, Mu B, et al. Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model. *Cancer Sci.* 2010; 101 (11): 2325-32. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01695.x.

93. Skacel M, Hicks DG, Tubbs RR. Tissue Microarrays and Their Modifications in High-Throughput Analysis of Clinical Specimens. En: Hayat MA. *Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas.* Elsevier; 2002. 57-65.

94. Escobar Stein J, Astudillo González A, Menéndez Rodríguez P, Belyakova E. Aplicación de los Tissue Microarrays en el estudio inmunohistoquímico de los tumores. *Rev Esp Patol.* 2006; 39 (1): 11-17. doi: 10.1016/S1699-8855(06)70003-4.
95. Rosai J. Técnicas especiales en patología quirúrgica. En: Rosai y Ackerman. *Patología Quirúrgica*. Edición. Lugar de publicación: Amolca; 2013. Páginas.
96. Zeilstra J, Joosten S, Vermeulen L, Koster J, Medema JP, Versteeg R, et al. CD44 Expression in Intestinal Epithelium and Colorectal Cancer Is Independent of p53 Status. *PLoS One.* 2013; 8 (8): e72849. doi: 10.1371/journal.pone.0072849.
97. Wangefjord S, Manjer J, Gaber A, Nodin B, Eberhard J, Jirström K. Cyclin D1 expression in colorectal cancer is a favorable prognostic factor in men but not in women in a prospective, population-based cohort study. *Biol Sex Differ.* 2011; 2: 10. doi: 10.1186/2042-6410-2-10.
98. Stoyanni A, Goussia A, Pentheroudakis G, Siozopoulou V, Ioachim E, Krikelis D, et al. Immunohistochemical Study of the Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype in Cancer of Unknown Primary: Incidence, Correlations and Prognostic Utility. *Anticancer Res.* 2012; 32 (4): 1273-81.
99. Lee SJ, Yang CS, Kim DD, Kang YN, Kwak SG, Park JB, et al. Microenvironmental interactions and expression of molecular markers associated with epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8 (11): 14270-14282.
100. Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Tanaka M, Miyake O, et al. Site-specific Tumor Grading System in Colorectal Cancer Multicenter Pathologic Review of the Value of Quantifying Poorly Differentiated Clusters. *Am J Surg Pathol.* 2014; 38 (2): 197-204. doi: 10.1097/PAS.000000000000113.

101. Bonetti L, Barresi V, Bettelli S, Domati F, Palmiere C. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: what is and ought to be known. *Diagn Pathol.* 2016; 11: 31. doi: 10.1186/s13000-016-0481-7

102. Lee VWK, Chan KF. Tumor Budding and Poorly-differentiated Cluster in Prognostication in Stage II Colon Cancer. *Pathol Res Pract.* 2018; 214 (3): 402-407. doi: 10.1016/j.prp.2017.12.019.

103. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.* 2018; 72 (1): 32-42. doi: 10.1007/s11418-017-1144-z.

104. Unidad de Vigilancia Epidemiológica. Departamento de Salud Gobierno Vasco-Delegación Territorial de Bizkaia. País Vasco, España: Alonso Fustel E, Baonza González I, Bidaurrazaga Van-Dierdonck J, Castells Carrillo C, Hernández Arricibita E, Sancho Uriarte P, et al; 2016. [https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/memorias\\_epidemiologica/es\\_def/adjuntos/2016/Bizkaia-2016-Vigilancia-Epidemiologica.pdf](https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/memorias_epidemiologica/es_def/adjuntos/2016/Bizkaia-2016-Vigilancia-Epidemiologica.pdf)

105. Portillo I, Idígoras I, Ojembarrena E, Arana E, Hurtado JL, Basurko R et al. Lesiones detectadas en el programa de cribado de cáncer colorrectal en el País Vasco: primera ronda 2009-2011. *Gastroenterol Hepatol.* 2013; 36 (5):301-8.

106. Henriksson ML, Edin S, Dahlin AM, Oldenborg PA, Öberg A, Van Guelpen B, et al. Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *Am J Pathol.* 2011; 178 (3): 1387-94. doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.008.

107. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013; 24 Suppl 6: 64-72. doi: 10.1093/annonc/mdt354.

108. Pai RK, Chen Y, Jakubowski MA, et al. Colorectal carcinomas with submucosal invasion (pT1): analysis of histopathological and molecular factors predicting lymph node metastasis. *Mod Pathol.* 2017; 30 (1): 113-122. doi: 10.1038/modpathol.2016.166.
109. Pimentel-Nunes P, Dinis-Ribeiro M, Ponchon T, Repici A, Vieth M, De Ceglie A et al. Endoscopic submucosal dissection: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy.* 2015; 47 (9): 829-54. doi: 10.1055/s-0034-1392882.
110. Hornick JL, Odze RD. Chapter 22-Polyps of the Large Intestine. En: Goldblum JR, Odze RD. *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas.* Third Edit. Philadelphia, Estados Unidos: Saunders-Elsevier, 2015; 2015. págs. 607-655.
111. Alonso Araujo SE, Arruda Alves PR, Habr-Gama A. Role of colonoscopy in colorectal cancer. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2001; 56 (1): 25-35.
112. Van Putten P, Hol L, Van Dekken H, Van Krieken J, Van Ballegooijen M, Kuipers E, et al. Inter-observer variation in the histological diagnosis of polyps in colorectal cancer screening. *Histopathology.* 2011; 58 (6): 974-81. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03822.x.
113. Toll A, Fabius D, Hyslop T, Pequignot E, DiMarino AJ, Infaantolino A, et al. Prognostic significance of high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Colorectal Dis.* 2011; 13 (4): 370-3. doi: 10.1111/j.1463-1318.2010.02385.x.
114. Yantiss RK, Bosenberg MW, Antonioli DA, Odze RD. Utility of MMP-1, p53, E-Cadherin, and Collagen IV Immunohistochemical Stains in the Differential Diagnosis of Adenomas with Misplaced Epithelium versus Adenomas With Invasive Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26 (2): 206-15.

115. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015; 21 (11): 1350-6. doi: 10.1038/nm.3967.
116. Tachon G, Frouin E, Karayan-Tapon L, Auriault ML, Godet J, Moulin V, et al. Heterogeneity of mismatch repair defect in colorectal cancer and its implications in clinical practice. *Eur J Cancer*. 2018; 95: 112-116. doi: 10.1016/j.ejca.2018.01.087.
117. Pearlman R, Markow M, Knight D, Chen W, Arnold C, Pritchard C, et al. Two-stain immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer may fail to detect mismatch repair deficiency. *Mod Pathol*. 2018; 31 (12): 1891-1900. doi: 10.1038/s41379-018-0058-y.
118. Choi S, Sung R, Lee T, Kim N, Yoon S, Lee E, et al. Podoplanin, alfa smooth muscle actin or S100A4 expressing cancer-associated fibroblasts are associated with different prognosis in colorectal cancers. *J Korean Med Sci*. 2013; 28 (9): 1293-301. doi: 10.3346/jkms.2013.28.9.1293.
119. Xu Z, Becerra AZ, Fleming FJ, Aquina CT, Dolan JG, Monson JR, et al. Treatments for Stage IV Colon Cancer and Overall Survival. *J Surg Res*. 2019; 242: 47-54. doi: 10.1016/j.jss.2019.04.034.
120. Bu L, Baba H, Yoshida N, Miyake K, Yasuda T, Uchihara T, et al. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2019; 38 (25): 4887-4901. doi: 10.1038/s41388-019-0765-y.
121. Higuchi Y, Kojima M, Ishii G, Aoyagi K, Sasaki H, Ochiai A. Gastrointestinal Fibroblasts Have Specialized, Diverse Transcriptional Phenotypes: A Comprehensive Gene Expression Analysis of Human Fibroblasts. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0129241. doi: 10.1371/journal.pone.0129241.



122. Mueller L, Goumas F, Affeldt M, Sandtner S, Gehling U, Brilloff S, et al. Stromal Fibroblasts in Colorectal Liver Metastases Originate From Resident Fibroblasts and Generate an Inflammatory Microenvironment. *Am J Pathol.* 2007; 171 (5): 1608-18.

123. Östman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev.* 2009; 19 (1): 67-73. doi: 10.1016/j.gde.2009.01.003.

124. Kwa M, Herum K, Brakebusch C. Cancer-associated fibroblasts: how do they contribute to metastasis? *Clin Exp Metastasis.* 2019; 36 (2): 71-86. doi: 10.1007/s10585-019-09959-0.

125. Warner DR, Greene RM, Pisano MM. Cross-talk between the TGFbeta and Wnt signaling pathways in murine embryonic maxillary mesenchymal cells. *FEBS Lett.* 2005; 579 (17): 3539-46.

126. Duffy, MJ. Clinical use of tumor biomarkers: An overview. *Klin. Biochem. Metab.* 2017. 25 (46): 157–161.

127. Mitrovic B, Schaeffer D, Riddell R, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol.* 2012; 25 (10): 1315-25. doi: 10.1038/modpathol.2012.94.

128. Herrera M, Islam A, Herrera A, Martín P, García V, Silva J, et al. Functional Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts from Human Colon Tumors Shows Specific Prognostic Gene Expression Signature. *Clin Cancer Res.* 2013; 19 (21): 5914-26. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0694.

129. Son G, Kwon M, Shin D, Shin N, Ryu D, Kang C. Comparisons of cancer-associated fibroblasts in the intratumoral stroma and invasive front in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98 (18): e15164. doi: 10.1097/MD.00000000000015164.

130. Gener P, Seras-Franzoso J, González Callejo P, Andrade F, Rafael D, Martínez F, et al. Dynamism, Sensitivity, and Consequences of Mesenchymal and Stem-Like Phenotype of Cancer Cells. *Stem Cells Int.* 2018; 2018: 4516454. doi: 10.1155/2018/4516454.
131. Mantilla C, Suárez Mellado I, Duque Jaramillo A, Navas MC. Mecanismos de señalización por  $\beta$ -Catenina y su papel en la carcinogénesis. *Rev CES Med* 2015; 29 (1): 109-28.
132. Ferrari N, Ranftl R, Chicherova I, Slaven N, Moeendarbary E, Farrugia A, et al. Dickkopf-3 links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive behaviours in cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 130. doi: 10.1038/s41467-018-07987-0.
133. Luga V, Wrana J. Tumor-Stroma Interaction: Revealing Fibroblast-Secreted Exosomes as Potent Regulators of Wnt-Planar Cell Polarity Signaling in Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 2013; 73 (23): 6843-7. doi: 10.1158/0008-5472.
134. Muniz Bourroul G, Fragoso HJ, Gomes JW, Bourroul V, Oshima C, Gomes T, et al. The destruction complex of beta-catenin in colorectal carcinoma and colonic adenoma. *Einstein (Sao Paulo).* 2016; 14 (2): 135-42. doi: 10.1590/S1679-45082016AO3678.
135. Liu J, Huang C, Peng C, Xu F, Li Y, Yutaka Y, et al. Stromal fibroblast activation protein alpha promotes gastric cancer progression via epithelial-mesenchymal transition through Wnt/  $\beta$ -catenin pathway. *BMC Cancer.* 2018; 18 (1): 1099. doi: 10.1186/s12885-018-5035-9.
136. Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau M, Battu S, Mathonnet M. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncol Lett.* 2017; 13 (6): 4571-4576.

137. Duronio R, Xiong Y. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013; 5 (3): a008904. doi: 10.1101/cshperspect.a008904.

138. Wu W, Wang X, Cheng A, Luo M, Ng S, To K, et al. Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. Crit Rev Oncol Hematol. 2013; 86 (3): 251-77. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.11.009.

139. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018; 68 (6): 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

140. Harpham W. Chronic Cancer? Oncology Times. 2009; 31 (5): 33-4. doi: 10.1097/01.COT.0000348044.36815.59

141. Duffy M. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers. Med Princ Pract. 2013; 22 (1): 4-11. doi: 10.1159/000338393.

142. Duffy M. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? Clin Chem. 2001; 47 (4): 624-30.

143. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Lee CS, Chun JG, McKee PA. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. Blood. 2006; 107 (4): 1397-404.

144. Keane FM, Yao TW, Seelk S, Gall MG, Chowdhury S, Poplawski SE, et al. Quantitation of fibroblast activation protein (FAP)-specific protease activity in mouse, baboon and human fluids and organs. FEBS Open Bio. 2013; 4: 43-54. doi: 10.1016/j.fob.2013.12.001.

145. Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin,

transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *J Clin Lab Anal.* 1999; 13 (6):273-9.

146. Uitte De Willige S, Malfiet J, Deckers J, Dippel D, Leebeek F, Rijken D. Plasma levels of soluble fibroblast activation protein in arterial thrombosis; determinants and cleavage of its substrate alpha-2-antiplasmin. *Int J Cardiol.* 2015; 178: 105-10. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.10.091.

147. Tillmanns J, Widera C, Habbaba Y, Galuppo P, Kempf T, Wollert K, et al. Circulating concentrations of fibroblast activation protein alpha in apparently healthy individuals and patients with acute coronary syndrome as assessed by sandwich ELISA. *Int J Cardiol.* 2013; 168 (4): 3926-31. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.06.061.

148. Hall JE. Chapter 37-Hemostasis and Blood Coagulation. En: Hall JE, Guyton A. *Medical Physiology.* 13th Ed. Estados Unidos: Elsevier; 2016. 483-94.

149. Caine G, Stonelake P, Lip G, Kehoe S. The hypercoagulable State of Malignancy: Pathogenesis and Current Debate. *Neoplasia.* 2002; 4 (6): 465-73.

150. Malone J, Wangensteen S, Moore W, Keown K. The fibrinolytic System. A key to Tumor Metastasis? *Ann Surg.* 1979; 190 (3): 342-349.

151. Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, Beitia M, Errarte P, Fernández A, et al. Dipeptidyl-peptidase IV activity is correlated with colorectal cancer prognosis. *PLoS One.* 2015; 10 (3):e0119436. doi: 10.1371/journal.pone.0119436.

152. Larrinaga G, Perez I, Ariz U, Sanz B, Beitia M, Errarte P, et al. Clinical impact of aspartyl aminopeptidase expression and activity in colorectal cancer. *Transl Res.* 2013; 162 (5):297-308. doi: 10.1016/j.trsl.2013.07.010.

153. Sanz B, Perez I, Beitia M, Errarte P, Fernández A, Blanco L, et al.

Aminopeptidase N activity predicts 5-year survival in colorectal cancer patients. *J Investig Med*. 2015; 63 (5):740-6. doi: 10.1097/JIM.000000000000199.

154. Sehgal V, Krishnan B, Besherdas K. How many biopsies at colonoscopy are required to confirm the diagnosis histologically in suspected colorectal cancer? *Gut. BMJ Journals*. 2012; PWE-220. doi:10.1136/gutjnl-2012-302514d.220

155. Novellademunt L, Foglizzo V, Cuadrado L, Encheva V, Snijders A, Li V. USP7 is a tumor-specific Wnt activator for APC-Mutated colorectal cancer by mediating  $\beta$ -Catenin Deubiquitination. *Cell Rep*. 2017; 21 (3): 612-627. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.072.

# MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla S1. Estadificación AJCC (American Joint Comitee on Cancer) del CCR (8ª edición).** La combinación de la profundidad de invasión parietal del tumor primario, la afectación ganglionar locorregional y las posibles metástasis a distancia dan lugar a un sistema de estadificación tumoral de uso universal en los diferentes comités de tumores hospitalarios (22).

T	N	M	Estadio
Tis	N0	M0	0
T1,T2	N0	M0	I
T3	N0	M0	IIA
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T1-T2	N1/N1c	M0	IIIA
T1	N2a	M0	IIIA
T3-T4a	N1/N1c	M0	IIIB
T2-T3	N2a	M0	IIIB
T1-T2	N2b	M0	IIIB
T4a	N2a	M0	IIIC
T3-T4a	N2b	M0	IIIC
T4b	N1-N2	M0	IIIC
Cualquier T	Cualquier N	M1a	IVA
Cualquier T	Cualquier N	M1b	IVB
Cualquier T	Cualquier N	M1c	IVC

**Tabla S2. Categorización del grado histológico AJCC (American Joint Comitee on Cancer) del CCR (8ª edición).** La mayor o menor similitud morfológica de la histología de la tumoración respecto a la cripta glandular no neoplásica va a marcar el grado de diferenciación tumoral (11) (22).

<b>Grado Histológico</b>	<b>Definición</b>	
Gx	El grado no puede ser determinado	
G1	Bien diferenciado	Bajo grado
G2	Moderadamente diferenciado	
G3	Pobremente diferenciado	Alto grado
G4	Indiferenciado	



**Tabla S3. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y BCAT nuclear en el centro del tumor primario.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo fue estadísticamente significativo ( $p=0,003$ ). Test Hosmer-Lemeshow ( $p=0,664$ ). R2 Nagelkerke ( $p=0,091$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

		<b>Centro</b>					
		<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>B</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Regresión Logística Múltiple		<b>Grado</b>	0,581	-0,14	0,865	0,517	1,448
		<b>pT</b>	<b>0,001</b>	0,92	2,500	1,432	4,367
		<b>N</b>	0,300	0,23	1,254	0,818	1,923
		<b>FAP(+)/BCAT(N)</b>	0,241	-0,14	0,871	0,691	1,097

**Tabla S4. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y BCAT nuclear en la metástasis en ganglio linfático locorregional.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo no fue estadísticamente significativo ( $p=0,084$ ). Test Hosmer–Lemeshow ( $p=0,894$ ). R2 Nagelkerke ( $p=0,061$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

<b>Metástasis Locorregional</b>						
	<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>B</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Regresión Logística Múltiple	<b>Grado</b>	0,796	-0,07	0,929	0,531	1,625
	<b>pT</b>	<b>0,036</b>	0,65	1,922	1,042	3,544
	<b>N</b>	0,159	0,44	1,554	0,842	2,869
	<b>FAP(+)/BCAT(N)</b>	0,454	-0,11	0,892	0,662	1,203

**Tabla S5. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CD44 alto en el centro del tumor primario.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo fue estadísticamente significativo (p=0,004). Test Hosmer-Lemeshow (p=0,821). R2 Nagelkerke (p=0,088). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

		<b>Centro</b>					
		<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>B</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Regresión Logística Múltiple		<b>Grado</b>	0,387	-0,22	0,798	0,478	1,331
		<b>pT</b>	<b>0,002</b>	0,87	2,381	1,376	4,122
		<b>N</b>	0,256	0,24	1,277	0,837	1,949
		<b>FAP(+)/CD44 alto</b>	0,458	-0,57	0,944	0,812	1,098

**Tabla S6. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CD44 alto en el frente de infiltración del tumor primario.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo fue estadísticamente significativo ( $p=0,003$ ). Test Hosmer–Lemeshow ( $p=0,895$ ). R2 Nagelkerke ( $p=0,097$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

<b>Frente de Infiltración</b>						
	<b>Variab</b> les	<b>p valor</b>	<b>B</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Regresión Logística Múltiple	<b>Grado</b>	0,540	-0,16	0,848	0,500	1,438
	<b>pT</b>	<b>0,001</b>	0,96	2,617	1,500	4,568
	<b>N</b>	0,483	0,15	1,167	0,758	1,795
	<b>FAP(+)/CD44 alto</b>	0,237	0,11	1,113	0,932	1,330

**Tabla S7. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CD44 alto en la metástasis en ganglio linfático locorregional.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo no fue estadísticamente significativo ( $p=0,131$ ). Test Hosmer–Lemeshow ( $p=0,860$ ). R2 Nagelkerke ( $p=0,052$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

<b>Metástasis Locorregional</b>						
	<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>B</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Regresión Logística Múltiple	<b>Grado</b>	0,538	-0,17	0,841	0,485	1,459
	<b>pT</b>	0,063	0,57	1,770	0,970	3,228
	<b>N</b>	0,184	0,41	1,510	0,822	2,776
	<b>FAP(+)/CD44 alto</b>	0,966	0,01	1,005	0,805	1,254

**Tabla S8. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CiclinaD1 alto en el centro del tumor primario.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo fue estadísticamente significativo ( $p=0,002$ ). Test Hosmer-Lemeshow ( $p=0,606$ ). R2 Nagelkerke ( $p=0,094$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

		<b>Centro</b>					
		<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>B</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Regresión Logística Múltiple		<b>Grado</b>	0,392	-0,22	0,801	0,483	1,330
		<b>pT</b>	<b>0,002</b>	0,86	2,374	1,373	4,106
		<b>N</b>	0,222	0,26	1,302	0,853	1,987
		<b>FAP(+)/Ciclina D1 alto</b>	0,273	0,08	1,087	0,936	1,263

**Tabla S9. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CiclinaD1 alto en el frente de infiltración del tumor primario.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo fue estadísticamente significativo ( $p=0,005$ ). Test Hosmer–Lemeshow ( $p=0,964$ ). R2 Nagelkerke ( $p=0,087$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

<b>Frente de Infiltración</b>						
	<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>B</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Regresión Logística Múltiple	<b>Grado</b>	0,425	-0,21	0,812	0,488	1,353
	<b>pT</b>	<b>0,003</b>	0,83	2,292	1,328	3,957
	<b>N</b>	0,223	0,27	1,310	0,848	2,024
	<b>FAP(+)/Ciclina D1 alto</b>	0,261	0,08	1,088	0,939	1,260

**Tabla S10. Regresión Logística Múltiple para predecir metástasis en el momento del diagnóstico: Expresión de FAP y CiclinaD1 alto en la metástasis en ganglio linfático locorregional.** Se incluyen Odds ratio (OR) e Intervalos de Confianza. De acuerdo con el Test Omnibus el modelo no fue estadísticamente significativo ( $p=0,138$ ). Test Hosmer–Lemeshow ( $p=0,503$ ). R2 Nagelkerke ( $p=0,051$ ). Los resultados estadísticamente significativos se resaltan en negrita.

<b>Metástasis Locorregional</b>						
	<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>B</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Regresión Logística Múltiple	<b>Grado</b>	0,756	-0,08	0,918	0,537	1,572
	<b>pT</b>	0,070	0,54	1,724	0,957	3,105
	<b>N</b>	0,358	0,28	1,324	0,728	2,409
	<b>FAP(+)/Ciclina D1 alto</b>	0,278	0,11	1,116	0,915	1,360



**Tabla S11. Análisis univariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/ $\beta$ CAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario para predecir supervivencia cáncer-específica a los 5 años. Se incluyen Odds ratio (OR) e intervalos de confianza inferior y superior al 95%.**

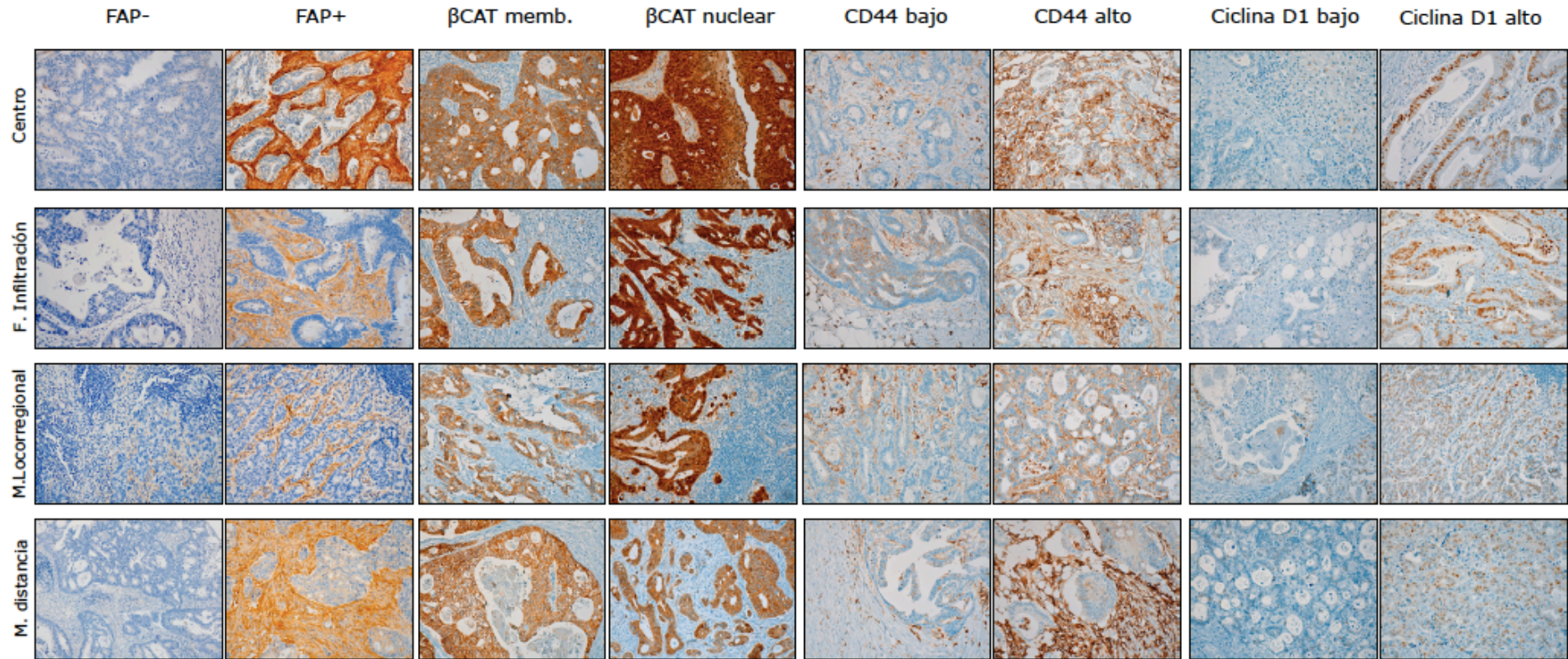
<b>FRENTE INFILTRACION</b>					
<b>5-CSS</b>					
	<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>OR</b>	<b>Inf.</b>	<b>Sup.</b>
<b>Cox univariante</b>	<b>FAP(+)/<math>\beta</math>CAT(N)</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,189	1,079	1,311
	<b>Grado</b>	<b>0,012</b>	1,441	1,085	1,915
	<b>pT</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,021	1,528	2,673
	<b>N</b>	<b>0,022</b>	1,284	1,036	1,592
	<b>M</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,161	1,596	2,927

**Tabla S12. Análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/ $\beta$ CAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario y metástasis en ganglio linfático para predecir supervivencia cáncer-específica a los 10 años. Se incluyen Odds ratio (OR) e intervalos de confianza inferior y superior al 95%.**

<b>Frente de Infiltración / 10-CSS</b>					
	<b>Variables</b>	<b>p valor</b>	<b>OR</b>	<b>Inf.</b>	<b>Sup.</b>
<b>Regresión de Cox Múltiple</b>	<b>pT</b>	<b>1x10<sup>-4</sup></b>	1,68	1,28	2,19
	<b>M</b>	<b>0,001</b>	1,64	1,24	2,17
	<b>FAP(+)/<math>\beta</math>CAT(N)</b>	<b>0,003</b>	1,15	1,05	1,26

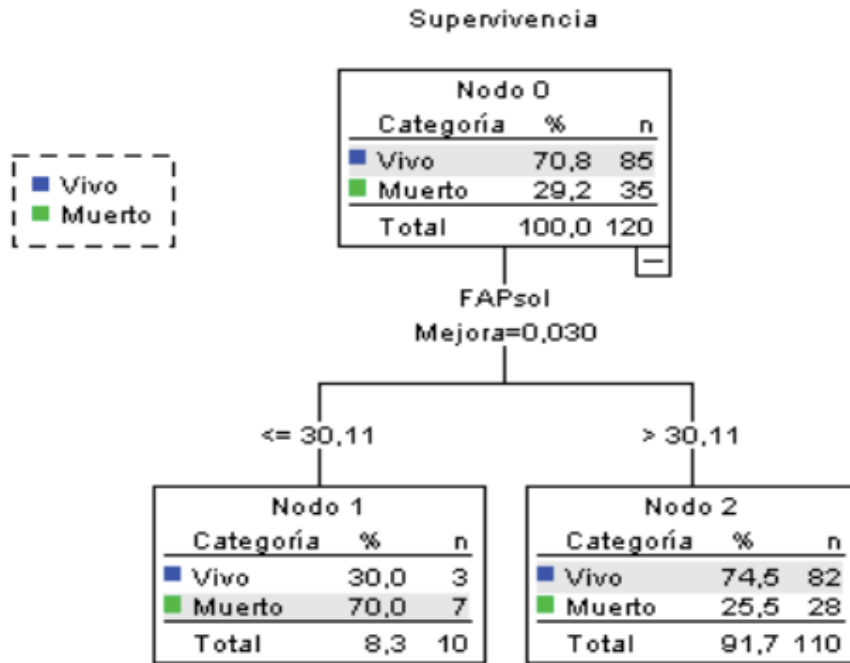
**Tabla S13. Análisis multivariante (modelo de regresión de Cox) de las variables clínico-patológicas y la combinación FAP(+)/BCAT(N) en el frente de infiltración del tumor primario y metástasis en ganglio linfático para predecir tiempo libre de enfermedad a los 10 años. Se incluyen Odds ratio (OR) e intervalos de confianza inferior y superior al 95%.**

		Frente de Infiltración / 10-DFS				Metástasis Locorregional / 10-DFS			
Variables		p valor	OR	Inf.	Sup.	p valor	OR	Inf.	Sup.
Regresión de Cox Múltiple	pT	<b>0,03</b>	1,47	1,04	2,08	<b>0,02</b>	1,61	1,09	2,39
	FAP(+)/BCAT(N)	<b>0,03</b>	1,14	1,01	1,29	<b>0,01</b>	1,31	1,11	1,54



**Figura S1. Imágenes de tinciones inmunohistoquímicas de FAP,  $\beta$ -Catenina, CD44 y Ciclina D1.** Se ilustra todo el espectro de resultados inmunohistoquímicos obtenidos en las diferentes localizaciones anatómicas a estudio en la evolución del Adc (centro de tumor primario, borde de infiltración, metástasis locorregional en ganglio linfático y metástasis hepática a distancia).

Árbol de decisión (Método CRT) para FAP soluble y supervivencia



**Figura S2. Valores de corte para determinación de Supervivencia cáncer-específica según método CRT.** El nivel de FAPs 30,11 ng/mL permitió separar de manera significativa ( $p=0.03$ ) en dos grandes grupos a los pacientes de AdC vivos (30% versus 74%).

