

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**TESIS DOCTORAL:**

Expresión de factores de inflamación y carcinogénesis en  
tumores de colon estadio II.

**DOCTORANDO**

Juan Francisco Carrión Maldonado.

**DIRECTORES**

Dr. D. Jacinto García García.  
Dr. D. Francisco J. Vizoso Piñeiro.

**Salamanca, 2016**



**Prof. Dr. D. Francisco Santiago Lozano Sánchez, Director Del Departamento de Cirugía, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.**

**Certifica:**

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “Expresión de factores de inflamación y carcinogénesis en tumores de colon estadio II”, realizada por D. Juan Francisco Carrión Maldonado, para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, reúne todas las condiciones necesarias para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Para que conste y a petición del interesado, expido el presente certificado en Salamanca a octubre de 2016.

Fdo. Prof. D. Francisco Santiago Lozano Sánchez.

**Prof. Dr. D. Jacinto García García, Profesor Titular de Cirugía,  
Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.**

**Dr. D. Francisco José Vizoso Piñeiro, Jefe de la Unidad de  
Investigación de la Fundación Hospital de Jove.**

**Certifican:**

Que D. Juan Francisco Carrión Maldonado, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Expresión de factores de inflamación y carcinogénesis en tumores de colon estadio II”, considerando que reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral en la Universidad de Salamanca.

Para que así conste y obre a los efectos oportunos, se expide el presente certificado, en Salamanca a octubre de 2016.

Fdo. Prof. Dr. D. Jacinto García G.

Fdo. Dr. D. Francisco J. Vizoso P.

## **I.ABREVIATURAS:**

<b>5-FU:</b>	5 Fluorouracilo.
<b>ADN:</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>ADNc:</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario.
<b>AEC:</b>	Asociación Española de Cirujanos.
<b>AJCC:</b>	Comité Americano Contra el Cáncer.
<b>CA 19.9:</b>	Antígeno Carbohidrato 19,9.
<b>CCR:</b>	Cáncer Colorrectal.
<b>CEA:</b>	Antígeno Carcinoembrionario.
<b>CMi:</b>	Célula Mononuclear Inflamatoria.
<b>CT:</b>	Célula Tumoral.
<b>EII:</b>	Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
<b>FAC:</b>	Fibroblasto Asociado a Cáncer.
<b>FIB:</b>	Fibroblasto.
<b>HNPCC:</b>	Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico.
<b>HPV:</b>	Virus de Papiloma Humano.
<b>IC:</b>	Inestabilidad Cromosómica.
<b>IHQ:</b>	Inmunohistoquímica.
<b>IMS:</b>	Inestabilidad Microsatélite.
<b>LV:</b>	Leucovorina.
<b>MEC:</b>	Matriz Extracelular.
<b>MMP:</b>	Metaloproteasa.
<b>MMR:</b>	Reparación de errores de apareamiento.
<b>PAF:</b>	Poliposis Adenomatosa Familiar.
<b>PAMP:</b>	Secuencias Moleculares asociados a patógenos.
<b>PET-TAC:</b>	Tomografía Axial Computarizada con Emisión de Positrones.
<b>SHO:</b>	Sangre oculta en heces.
<b>TAC:</b>	Tomografía Axial Computarizada.
<b>TIMP:</b>	Inhibidor Tisular de Metaloproteasa.
<b>TLR:</b>	Receptor Tipo Toll.
<b>TNM:</b>	Tumor, Nódulo, Metástasis.
<b>TS:</b>	Timidilato Sintasa.
<b>UICC:</b>	Unión Internacional Contra el Cáncer.

## CONTENIDO

<b>I.LABREVIATURAS.</b>	<b>5</b>
<b>II.INTRODUCCIÓN.</b>	<b>8</b>
1.- EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL.	9
2.- ETIOLOGÍA.	9
3.- CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO.	10
4.- MARCADORES TUMORALES.	12
5.- CRIBADO DEL CCR.	13
6.- ESTADIAJE TUMORAL.	14
7.- TRATAMIENTO.	18
8.- PRONÓSTICO.	21
9.-ORIGEN DEL CCR.	23
10.- MARCADORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS.	24
10.1.- MARCADORES HISTOPATOLÓGICOS.	25
10.2.- MARCADORES MOLECULARES.	26
10.3.- RECOMENDACIONES ACTUALES EN ESPAÑA PARA UTILIZACIÓN DE BIOMARCADORES EN EL CCR.	29
11.- LA MATRIZ EXTRACELULAR Y EL DESARROLLO TUMORAL.	32
11.1.- FIBROBLASTOS.	35
11.2.- METALOPROTEASAS (MMP).	36
11.3.- RECEPTOR TIPO TOLL O "TOLL LIKE RECEPTOR" (TLRS).	38
12.- INMUNOTERAPIA.	41
<b>III.HIPÓTESIS Y OBJETIVO.</b>	<b>43</b>
1.-HIPÓTESIS DE TRABAJO.	44
2.-OBJETIVOS.	45
<b>IV.MATERIAL Y MÉTODO.</b>	<b>46</b>
1.-DISEÑO DEL ESTUDIO.	47
2.- ASPECTOS ÉTICOS.	47

<b>3.- PACIENTES.</b>	<b>47</b>
3.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS PACIENTES.	47
3.2.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE LOS PACIENTES.	48
<b>4.- MANEJO DE LA MUESTRAS.</b>	<b>50</b>
4.1.- TÉCNICA DE ELABORACIÓN DE MALLAS DE TEJIDO Y TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.	50
4.1.- ANÁLISIS DE LAS TINCIONES.	53
4.2.- ANÁLISIS DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS.	55
<b>V.RESULTADOS.</b>	<b>56</b>
<b>1.- CASOS PERDIDOS.</b>	<b>57</b>
<b>2.- EXPRESIÓN GLOBAL DE MMP11, MMP13, TLR4.</b>	<b>58</b>
<b>3.- EXPRESIÓN DE MMP11, MMP13 Y TLR4 POR DISTINTOS TIPOS CELULARES.</b>	<b>59</b>
<b>4.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES.</b>	<b>60</b>
<b>5.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES CON LA RECURRENCIA GLOBAL.</b>	<b>64</b>
<b>6.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES CON LA RECURRENCIA TUMORAL LOCAL.</b>	<b>70</b>
<b>7.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES, CON LA RECURRENCIA POR CARCINOMATOSIS.</b>	<b>76</b>
<b>8.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES, CON LA RECURRENCIA A DISTANCIA.</b>	<b>80</b>
<b>9.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES, SEGÚN LA RECURRENCIA POR METÁSTASIS HEPÁTICAS.</b>	<b>87</b>
<b>10.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES, CON LA RECURRENCIA POR METÁSTASIS PULMONARES.</b>	<b>93</b>
<b>11.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS DIFERENTES FACTORES CON LA SUPERVIVENCIA.</b>	<b>99</b>
<b>VI.DISCUSIÓN</b>	<b>106</b>
<b>VII.CONCLUSIONES</b>	<b>113</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>115</b>

## **II.INTRODUCCIÓN**



## **1.- Epidemiología del Cáncer Colorrectal.**

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer puesto en general de las neoplasias más comunes; y el segundo en los países desarrollados considerando ambos sexos.

La incidencia oscila entre 0,5 casos/100.000 habitantes en países como la India, hasta 51,3 casos/100.000 habitantes en Nueva Zelanda; con una evidente mayor prevalencia en los países desarrollados; es el cáncer más frecuente en las personas mayores de 75 años de edad. (1,2)

Las tasas más elevadas se encuentran en América del Norte, Europa Occidental y Oceanía, mientras que en el otro extremo tenemos a Sudamérica, Asia y África con tasas más bajas.

En España se estima una incidencia de 32.240 casos por año, lo que equivale a que cada día se diagnostican 88 casos nuevos de CCR, causando 14.700 fallecimientos/año y con una prevalencia a los 5 años de 89.705 casos. Esto demuestra claramente, que el CCR constituye un verdadero problema de salud pública a pesar de la gran evolución en el tratamiento y diagnóstico. (3)

## **2.- Etiología.**

En el CCR existe gran variabilidad en las tasas epidemiológicas según las diferentes poblaciones; los datos sobre estudios según su clase social, hábitos y estilo de vida, ponen de manifiesto que el CCR es sensible a factores ambientales; tenemos así, que el 80% de los casos son de tipo esporádico y apenas el 20% restantes son debido a afectación familiar por diferentes síndromes genéticos. (4,5)

En lo que respecta al CCR esporádico, este es causado por factores medioambientales; la dieta se conoce que juega un papel importante; la ingesta de fibra vegetal, frutas y vegetales son factores protectores al aumentar el tránsito colónico y, por lo tanto, estar la mucosa menos tiempo expuesta a los factores lesivos. El consumo de agua, calcio, selenio, fenoles, índoles y vitaminas, son

factores protectores, mientras que las carnes rojas, el tabaco y el alcohol, así como también la obesidad, aumentan el riesgo de aparición del CCR. (6)

Dentro del tipo hereditario, se pueden reconocer dos grandes grupos con afectación familiar:

- La Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) que se trata de un síndrome con afectación autosómica dominante, donde el riesgo de degenerar a CCR en las personas afectadas es de casi el 100%, existiendo varios subtipos.
- El Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC), o también conocido como síndrome de Lynch, tienen un riesgo aproximado del 70%, y es la forma más común de cáncer hereditario; dentro de este síndrome se clasifican en dos tipos según la localización, que pueden ser tumores colónicos (Lynch I) o asociarse también a tumores extracolónicos (Lynch II).(1,2)

### **3.- Clínica y diagnóstico.**

La clínica de los tumores colónicos puede variar dependiendo de su localización debido a las diferencias anatómicas que posee el colon. Por ejemplo, el colon derecho se caracteriza por tener el diámetro de la luz más amplia, por lo que los síntomas predominantes suelen ser anemia y melenas (por sangrados crónicos y ocultos); mientras que los tumores de colon izquierdo en donde la luz intestinal es de menor calibre, la clínica predominante es un cambio del hábito intestinal, estreñimiento y rectorragias.

A pesar de los síntomas, alrededor de un 25% de los pacientes en el momento diagnóstico tienen enfermedad avanzada.

Para el diagnóstico de CCR existe gran variabilidad de pruebas diagnósticas, siendo la Colonoscopia la prueba de elección o "*gold estándar*", con una sensibilidad y especificidad del 90-95%, y con un índice de complicaciones menor al 1%. Esta técnica tiene la ventaja de que, además de poder realizar el diagnóstico clínico y anatómo-patológico con la toma de biopsias, permite el marcaje (tatuaje)

para la futura localización de la lesión, así como de maniobras terapéuticas como la colocación de prótesis auto expansibles en caso de tumores obstructivos, o resecciones completas de los tumores en estadios iniciales.

En la evaluación preoperatoria es recomendable tener un estudio de la longitud completa del colon, ya que existe hasta 9% de lesiones colónicas sincrónicas. (7)

Otra prueba fundamental para la evaluación completa del CCR es la Tomografía Axial Computarizada (TAC) que permite la localización del tumor, su relación con órganos y estructuras adyacentes y la presencia de metástasis, por lo que es de gran importancia en el estadiaje del tumor y en la decisión de la estrategia quirúrgica. (2).

A día de hoy, con la evolución de la tecnología se ha logrado un gran avance en las imágenes obtenidas por TAC, con una gran mejoría en la calidad y definición de las imágenes y sus procesadores que permiten la reconstrucción digital, y a dado lugar a la aparición de la Colonografía por TAC o “colonoscopia virtual”, que tiene cada vez más indicaciones para su uso. Esta última técnica es de gran interés y aplicación para pacientes con tumores obstructivos que no permiten paso del colonoscopio convencional o cuando existe intolerancia o contraindicación por parte del paciente para la colonoscopia convencional. Existen estudios que evalúan el papel de la Colonografía por TAC en el cribado primario sin resultados concluyentes de momento, pero que a futuro podrían tener algunas indicaciones que reemplacen a la colonoscopia convencional, por ser esta menos invasiva y menor riesgo de complicaciones graves. (8)

Otra prueba actual de interés en el CCR es la Tomografía Axial Computarizada con Emisión de Positrones (PET-TAC), consiste en una prueba no invasiva que capta el metabolismo celular, pudiendo así detectar las células que produzcan un metabolismo aumentado (por ejemplo las células tumorales), mediante la inyección de sustancias marcadas radioactivamente.

De momento su mayor utilidad en CCR se basa en tener la capacidad de detectar metástasis ocultas y así poder hacer un estadiaje más preciso. Así mismo esta técnica ayuda a contrastar sospechas clínicas de recurrencias o enfermedad diseminada, evitando cirugías innecesarias. Se estima que los resultados aportados por esta técnica pueden cambiar la actitud terapéutica entre un 22 – 68% de los

casos. Además, en el tratamiento neoadyuvante del cáncer de recto, permite evaluar la respuesta con mejor sensibilidad que el TAC, 100% vs 78%, respectivamente. (9,10)

#### **4.- Marcadores Tumorales.**

Los principales marcadores tumorales en el cáncer de colon son: el Antígeno Carcinoembrionario y el Antígeno Carbohidrato Ca19.9:

- **Antígeno Carcinoembrionario (CEA):**

El CEA es un glicoproteína que se expresa en el aparato digestivo fetal y que desaparece en el momento del nacimiento. Su expresión se observa en enfermedades como la cirrosis, pancreatitis, úlcera péptica, enfermedad inflamatoria intestinal y en fumadores; la sensibilidad del CEA para el CCR es baja por lo que no se puede utilizar como herramienta para diagnóstico precoz o cribado. (11)

Múltiples estudios confirman al CEA como factor pronóstico independiente, que presenta un correlación directamente proporcional entre su elevación y la extensión tumoral, sin ser exacta ya que interfieren más factores como la diferenciación tumoral y difieren en cada estadio. Los valores de CEA tienen gran utilidad en el post-operatorio ya que su valor suele normalizarse luego de la cirugía; por lo que cualquier elevación posterior da una alta sospecha de la existencia de recurrencia tumoral; sirve, además, para monitorizar evolución y respuesta del tratamiento quimioterápicos en pacientes que presentan metástasis. (12)

- **CA 19.9:**

Tiene una utilidad similar al CEA, aunque menos específica, su elevación suele estar más relacionada con la aparición de metástasis hepáticas. (13)

## 5.- Cribado del CCR.

En la actualidad debido a los programas de despistaje y a la precaución por parte del personal sanitario con la creación de protocolos de cribado, se logran diagnosticar muchos tumores en fase asintomática, aunque todavía existe un 25-30% de casos que se diagnostican porque los pacientes debutan con un cuadro de obstrucción o perforación en estadios avanzados.

Las campañas de cribado de CCR son necesarias y beneficiosas, ya que 1 de cada 17 personas desarrollaría un cáncer de no realizarse estas medidas.

El tipo de pruebas para el cribado del CCR varía en función de los factores de riesgo de cada paciente, del sistema de salud y disponibilidad de las mismas. Según la Asociación Mundial de Gastroenterología existen varios niveles posibles de cribado para el CCR, que van desde el nivel I, cuando los recursos son elevados, hasta el nivel VI donde se tienen recursos mínimos y limitados, barajando un abanico de posibilidades de pruebas entre: sangre oculta en heces, sigmoidoscopia, enema con doble contraste, colonoscopia o colonografía por tomografía computada.

Hay que tener en cuenta que el 75% de los CCR se desarrollan en pacientes de forma esporádica sin factores de riesgo, el 15% en pacientes con riesgo intermedio como antecedentes familiares, y el 10% en pacientes con alto riesgo (Síndrome de Lynch, HNPCC, PAF, Enfermedad inflamatoria intestinal). (14)

Así tenemos que según el riesgo individual de cada paciente, se les clasifica en diferentes categorías; con distintas recomendaciones sobre el tipo de prueba, su frecuencia y edad de inicio de las mismas (Tabla 1).

**Tabla 1:** Despistaje y Vigilancia de Cáncer Colorrectal

	<b>Categoría de riesgo</b>	<b>Recomendación</b>	<b>Edad de inicio</b>	<b>Intervalo</b>
<b>Riesgo Medio</b> <b>5%</b>	Todos	SHO, Sigmoidoscopia Colonoscopia	50 años	Cada 5-10 años
	Pariente 1er grado mayor 60 años	Colonoscopia	50 años	Cada 5-10 años
<b>Riesgo Moderado</b> <b>10 - 30 %</b>	Pariente 1er grado menor 60 años	Colonoscopia	40 años o 10 años antes de primer caso en la familia	Cada 5 años
	Pólipo neoplásico previo mayor 1 cm	Colonoscopia	3 años después de polipectomía	3-5 años
	Pólipo pequeño simple	Colonoscopia	5 años después de polipectomía	3-5 años
	Historia de CCR	Colonoscopia	Al momento de la resección.	1 - 5 años
	**EII	Colonoscopia	8 años después del Dx.	1 - 2 años
<b>Riesgo Elevado</b>	PAF	Sigmoidoscopia , examen genético	12 años	1 año
	CCHNP	Colonoscopia	21 años	2 años

\*SHO= Sangre oculta en heces. EII= Enfermedad inflamatoria intestinal. PAF= Poliposis Adenomatosa familiar. CCHNP= Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico.

Fuente: Cirugía AEC (1)

## 6.- Estadiaje tumoral.

Existen múltiples clasificaciones clásicas de los tumores de colon; una de las más relevantes es la clasificación de Dukes, en la que a lo largo del tiempo se han realizado modificaciones por Astler y Coller (1954) y por Turnbull (1967). En la clasificación de Dukes, una de las principales limitaciones es la de no subdividir el estadio C en subgrupos en relación con el número de ganglios y su localización. Por todo ello, el “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC) (Tabla 2) y la “Unión Internacional Contra el Cáncer” (UICC) (Tabla 3) desarrollaron el sistema TNM para el CCR, el cuál es más completo, aunque agrega algo de complejidad en su aplicación. (2)

**Tabla 2:** Definición TNM

DEFINICIONES TNM:

➤ **Tumor primario (T):**

- Tx: No puede evaluarse el tumor primario
- T0: No hay indicación de tumor primario
- Tis: Carcinoma in situ (intraepitelial o invasión de la lámina propia)
- T1: El tumor invade la submucosa
- T2: El tumor invade la muscularis propia
- T3: El tumor invade la serosa o los tejidos perirectales
- T4: El tumor invade otros órganos y/o perfora el peritoneo visceral
- T4a: Tumor invade el peritoneo visceral.
- T4b: Tumor invade o esta adherido a otros órganos o estructuras.

➤ **Ganglios linfáticos regionales (N):**

- Nx: No pueden evaluarse los ganglios regionales
- N0: No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
- N1a: Metástasis en 1 ganglio linfático regional.
- N1b: Metástasis en 2-3 ganglios regionales.
- N1c: Depositos de tumor en el mesenterio, subseroso o pericólico sin afectación de los ganglios regionales.
- N2: Metástasis en 4 ó más ganglios linfáticos regionales.
- N2a: Metástasis en 4-6 ganglios regionales.
- N2b: Metástasis en 7 o mas ganglios.

➤ **Metástasis a distancia:**

- Mx: No puede evaluarse la metástasis distante
- M0: No hay metástasis a distancia
- M1: Metástasis a distancia.
- M1a: Metástasis confinada a órgano o un sitio.
- M1b: Metástasis en mas de dos órganos o sitios.

Fuente: *American Joint Committee on Cancer (AJCC) 7ma edición.* (15)

**Tabla 3:** Comparativa entre Clasificación AJCC (7ma edición), Dukes, Astler  
Coller.

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Dukes</b>	<b>Astler Coller</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0	---	---
<b>I</b>	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
<b>IIA</b>	T3	N0	M0	B	B2
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0	B	B2
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0	B	B3
<b>IIIA</b>	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1-C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
<b>IVA</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1a	---	---
<b>IVB</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1b	---	---

Fuente: *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) 7ma edición. (15).



La AJCC, realiza actualizaciones de la clasificación cada 5 años para una mejor forma de unificar conceptos y clasificar pacientes con su consecuente tratamiento.

Hay que tener en cuenta que la vía linfática es la principal forma de expansión en el CCR, por lo que la determinación de la infiltración de la pared intestinal y la afectación de los ganglios regionales son de gran utilidad para el estadiaje (Figura 1). Por lo tanto es fundamental una participación activa del patólogo con su estudio detallado de la pieza tumoral con intención de unificar conceptos y estándares de calidad en el informe.

**Figura 1:** Estadio Cáncer de Colon

Fuente: *National Cancer Institute*. [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)

Los 3 parámetros más determinantes desde el punto de vista de anatomía quirúrgica son:

- El número de ganglios en la pieza anatómica, aceptando 12 ganglios como punto de corte; ya que los estudios demuestran que hay relación entre el número de ganglios estudiados y la supervivencia. (16)
- La calidad del mesocolon, clasificado en 3 según el plano de infiltración tumoral, meso-cólico, intra-mesocólico, y muscularis propia.
- La radicalidad de resección: R0 si existe una ausencia de tumor residual; R1 si hay evidencia de tumor residual microscópicamente (incluye tumor perforado); R2 si el tumor residual es macroscópico. (2)

## 7.- Tratamiento.

El tratamiento del cáncer de colon varía principalmente en función del estadio tumoral, y que puede ser desde pequeñas resecciones locales endoscópicas hasta complejos tratamientos multidisciplinarios que involucran a oncólogos, radiólogos, endoscopistas, y cirujanos.

Los tratamientos por los diferentes estadios podrían definirse como:

- **Estadio 0:** la mayoría de las veces con una polipectomía o una escisión por colonoscopia es suficiente para el tratamiento, aunque en casos de tumores grandes, extirpación endoscópica incompleta o difícil, puede ser necesaria la resección quirúrgica con colectomía.
- **Estadio I:** cuando el cáncer se asienta sobre un pólipo y este se logra extirpar completamente sin márgenes afectos, se podría optar por escisión mediante colonoscopia. Pero si el tumor muestra displasia de alto grado, márgenes incompletos o no se asienta sobre pólipo, lo recomendable es la colectomía. En este estadio no es necesario tratamiento adyuvante.
- **Estadio II:** el tratamiento podría variar entre cirugía sola o tratamiento posterior adyuvante, este estadio es el objetivo del estudio por lo que se desarrollara detalladamente más adelante.
- **Estadio III:** el cáncer ya tienen diseminación a los ganglios regionales, sin afectación de otros órganos a distancia, por lo que el tratamiento estándar

consiste en cirugía con colectomía y posterior quimioterapia y en casos seleccionados podrían beneficiarse además de radioterapia.

- **Estadio IV:** cuando existe invasión tumoral a otros órganos, existe múltiples opciones. La quimioterapia en esta etapa es fundamental, como tratamiento neoadyuvante, adyuvante o paliativo. Las opciones tienen que ser evaluadas según el estado del paciente, la diseminación tumoral y las probabilidades de intención curativa (que cada vez son mayores al tener mejores respuestas a la quimioterapia, radioterapia y a cirugías más agresivas) o simplemente de forma sintomática. (17)

- **Estadio II, particularidades en el tratamiento:**

Existen acuerdos para tratamiento del cáncer de colon; en estadio I la evidencia científica ha demostrado que la terapia adyuvante no presenta claros beneficios; mientras que en el estadio III se ha demostrado que existe incremento en la supervivencia global y en el tiempo libre de enfermedad.

En los casos estadio II, los ensayos clínicos no han demostrado una clara mejoría en los pronósticos; siendo el tratamiento adyuvante o la observación, dos opciones válidas. (18)

El índice de supervivencia a los 5 años es de aproximadamente un 70 a 85% por lo que el verdadero desafío se presenta el momento de decidir que pacientes se podrían beneficiar del tratamiento adyuvante luego de la resección quirúrgica.

La mayoría de evidencia que existe a día de hoy, incluyen en su muestra a pacientes con estadios III, sin encontrar grandes estudios que tengan exclusivamente en su muestra a estadios II, por lo que de momento la decisión se toma por un comité clínico quirúrgico de forma personalizada según riesgos y beneficios del paciente. (19)

Los riesgos de mayor recurrencia a tomarse en cuenta son: la infiltración de la pared tumoral (estadio T4), la extirpación de menos de 12 ganglios, la invasión linfocelular, el grado de diferenciación tumoral (siendo de peor pronóstico el grado poco diferenciado), la presencia de obstrucción intestinal el momento diagnóstico y la Inestabilidad Microsatélite. (20)

Al momento de decidir hay que tener una especial consideración en los factores del paciente, su estado general y comorbilidades para evaluar la tolerancia a la quimioterapia.

Los regímenes de quimioterapia adyuvante estándar recomendados para el cáncer de colon en estadio II son FOLFOX (leucovorina cálcica, 5- fluorouracilo y oxiplatino) y el agente único 5-FU o capecitabina.

Los efectos de 5-FU/LV (5- fluorouracilo y leucovorina) con o sin oxiplatino son bien documentados en la literatura, efectos secundarios graves ocurren hasta en un 14% y con necesidad de suspensión del tratamiento en 6%; si a la terapia se le agrega oxiplatino los porcentajes ascienden a un 19% y 12% respectivamente. En estudios de calidad de vida luego del tratamiento con 5-FU se puede observar que los pacientes tardan un año en recobrar su estado basal; al añadir oxiplatino a la terapia los efectos de la neuropatía continúan incluso al suspender el tratamiento y un 10% de los pacientes mantienen el síntoma hasta 2 años después. (21)

Los fármacos con anticuerpos monoclonales (Cetuximab, Panitumumab o Bevacizumab) agregan mayor toxicidad y efectos secundarios por lo que de momento no se recomienda su uso sistemáticamente.

Los efectos secundarios de los regímenes de quimioterapia deben considerarse para cada paciente. El oxiplatino se asocia con un mayor nivel de toxicidad y mayor potencial para la neurotoxicidad por lo que no sería apropiado para pacientes con neuropatías. (22)

En los pacientes que no tienen los factores antes citados y en caso de que el tumor presenta la inestabilidad de microsatélites sería un candidato favorable para no someterse a la quimioterapia adyuvante, para otros pacientes que tienen factores de riesgo menos peligrosos o no tienen un buen estado de salud, el agente único 5-FU o la capecitabina posiblemente se pueda elegir en lugar de una combinación con oxiplatino.

La terapia adyuvante disminuye el riesgo de recurrencia en un 30% para el cáncer de colon en cualquier estadio, pero el beneficio absoluto individual es diferente para cada paciente; por ejemplo, si el riesgo inicial es de un 50% para un paciente, la reducción de 30% sería un 15%; en caso de un riesgo inicial es de 10% la reducción absoluta es de sólo un 3%. Así por número de pacientes a tratar para prevenir un evento (recurrencia o muerte) es entre 15 y 30 pacientes, en el

grupo de alto riesgo; mientras que en el grupo de bajo riesgo hay que tratar a más de 50 pacientes para prevenir un evento. (19)

## **8.- Pronóstico.**

Existen varios factores clínicos, anatómicos e histológicos que influyen en el pronóstico general de los paciente con CCR; la identificación de estos factores permiten definir a los pacientes en subgrupos según el riesgo de recurrencia y su supervivencia (Tabla 4).

Existen datos muy controvertidos en las variables dependientes del paciente, como son: la edad, el sexo, la localización del tumor, etc. Por lo que de momento no se ha logrado concluir cual de estas variables influyen realmente en el pronóstico. Algo que si ha demostrado que influye negativamente en el pronóstico de los pacientes luego de una cirugía potencialmente curativa es:

- La extensión tumoral en la pared (T) y la afectación de los ganglios regionales (N).
- La presencia de enfermedad residual.
- Invasión tumoral perineural y linfovascular.
- Grado de diferenciación tumoral.
- Bajo grado de regresión en los pacientes que recibieron neoadyuvancia.
- Niveles elevados de CEA al diagnóstico.
- Perforación tumoral y obstrucción intestinal al momento diagnóstico.

En lo que respecta a los parámetros moleculares del tumor, todavía están en fase de estudio y a la espera de confirmación; el único factor que ya se utiliza para la toma de decisiones clínicas es la Inestabilidad Microsatélite. (23)

**Tabla 4:** Porcentaje de Supervivencia y recurrencia según estadio del CCR.

Fuente : Guías Clínicas AEC Cirugía Colorrectal. 2da edición.

- **Ganglio centinela en el CCR.**

Otra tema que ha despertado interés en la actualidad, y pendiente de validar, es el marcaje y estudio del ganglio centinela luego de la extracción de la pieza. Existen múltiples cifras según varios autores y diferentes técnicas de tinción, que podrían cambiar el estadio a uno superior por la detección de micro metástasis, que no hubieran sido detectadas con la técnica habitual. Así, según Saha *et al*, hasta un 32% en los cánceres colónicos incrementan su estadio con esta técnica. (24)

## 9.-Origen del CCR: Modelos moleculares en estudio y vías de desarrollo.

El pronóstico del CCR no solo depende de la extensión tumoral en el momento diagnóstico, sino de varios factores adicionales referentes al comportamiento tumoral, sus características específicas, las vías del crecimiento y el ambiente en el que se va a desarrollar el tumor conocido como “micro entorno”. Múltiples estudios en la actualidad van encaminados a determinar estos parámetros y poder establecer su utilidad clínica.

Desde la descripción clásica de la secuencia “adenoma-adenocarcinoma”, se ha evolucionado mucho en el conocimiento de los mecanismos de carcinogénesis del CCR. Se observó que no todos los tumores se pueden explicar por esta misma vía; por lo que surgieron otras dos alternativas, obteniendo como resultado 3 vías diferentes y con comportamiento del tumor diferente en cada una de ellas, por lo tanto, con la obtención de diferentes marcadores y respuestas frente a un mismo tratamiento. (25)

Para el desarrollo del CCR, como en todos los tumores, se produce una serie de cambios genéticos o epigenéticos que darán el punto de inicio en la secuencia del desarrollo tumoral. Estos cambios proporcionan a la célula características especiales de supervivencia, donde destacan:

- La insensibilización ante señales apoptóticas.
- Potencial replicativo ilimitado.
- Capacidad de evadir el sistema inmune.
- Capacidad de inducir angiogénesis y desarrollar metástasis. (26)

Según los genes alterados y diferentes rutas moleculares, se ha desarrollado una clasificación de las vías de progresión: vía Supresora, vía Mutadora y vía Serrada, que se describen a continuación:

- **Inestabilidad Cromosómica (IC) o vía supresora:** En esta vía se produce una alteración del cariotipo, con ganancia, pérdida o translocaciones cromosómicas. Existe una pérdida del gen “supresor” *APC*, que es el encargado de suprimir el ciclo celular cuando se han detectan errores. Para su detección se realizan técnicas con análisis de ploidias. Dentro de este grupo encontramos a los CCR esporádicos (cerca del 85 %).

- **Inestabilidad microsátélites (IMS) o vía mutadora:** son alteraciones en los sistemas de reparación, permitiendo así que se produzcan errores repetidos durante la replicación del ADN (*MLH1, MLH2, MLH6, PMS2*, entre otros), con la acumulación de errores en los microsátélites, que están distribuidos por todo el genoma. Esta alteración esta en aproximadamente el 15% de los CCR, dentro del grupo de Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (CCRHNP) o Síndrome de Lynch, y en algunos de los CCR del grupo esporádico. Dentro de los genes implicados encontramos el *TGFBR2*. Este tipo de tumores presentan características clínicas y pronósticas diferentes, así como diferente respuesta al tratamiento antitumoral, que se verá mas adelante.
- **Fenotipo metilador o vía serrada:** Aquí se produce una metilación de las islas CpG (normalmente desmetiladas) que son regiones del ADN que tienen la capacidad de inactivar al gen. Esta metilación surgiría de una lesión precursora serrada como los pólipos hiperplásicos, serrados sésiles y adenomas serrados, explicando cerca del 35 % de los CCR. Clínicamente se presenta más en mujeres, en tumores de localización proximal, en tumores diferenciados, y con mayor mutación del gen *BRAF*.

En los últimos años se ha desarrollado esta compleja clasificación, que tiene la intención de predecir el pronóstico de los tumores y la magnitud de su respuesta frente a diferentes tratamientos, mejorando así la efectividad en las terapias, al ser más dirigidas según sus características.(27-29)

## **10.- Marcadores pronósticos y predictivos.**

Múltiples investigaciones han logrado descubrir marcadores pronósticos que aportan mejor información sobre la evolución y grado de agresividad que tiene el tumor, así como otros marcadores que intentan predecir la respuesta frente a un determinado tratamiento, dentro de estos marcadores tenemos:



## 10.1 Marcadores Histopatológicos.

Demuestran las características del tumor y su relación de invasión en el tejido:

- **Invasión Linfovascular:** demuestra la infiltración de células tumorales en los vasos sanguíneos y drenaje linfático, y al ser positivo es un indicador de mal pronóstico. (30)
- **Grado de diferenciación tumoral:** es la relación entre el tejido normal y la formación de estructuras glandulares (Tabla5). Se describe como bien diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado e indiferenciado. Esta graduación puede ser subjetiva y haber diferencias entre observadores, pero se ha demostrado que tiene influencia pronóstica. Para su evaluación se debe tomar de la zona con mayor afectación. (31,32)

**Tabla 5:** Grado diferenciación tumoral según porcentaje de estructuras glandulares.

Grado tumoral	Porcentaje
Indiferenciado	Menor de 25 %
Pobremente diferenciado	25 – 50 %
Moderadamente diferenciado	50 – 75 %
Bien diferenciado	Mayor de 75 %

- **Invasión perineural:** cuando existe infiltración de los nervios, también es un indicador de mal pronóstico. (33)
- **Borde tumoral:** cuando el límite del tumor y el tejido colónico normal presenta un tipo infiltrativo o “*Budding*” que se define como la presencia de células asiladas o grupos de más de 5 células situadas en borde tumoral. Se asocia a mal pronóstico, mientras que el tipo mixto o expansivo es de mejor pronóstico. (31)

- **Infiltración linfocitaria:** hace referencia a la presencia de linfocitos en la zona tumoral e indica que existe una respuesta inmune frente al tumor, por lo que es marcador de buen pronóstico. (34)

## 10.2 Marcadores Moleculares.

Dentro de los biomarcadores, los que parecen tener mayor implicación clínica y que han despertado mayor interés en los estudios son:

- **Inestabilidad de los Microsatélites (IMS):** Esto se define por la alteración en la secuencia de los microsatélites, con ganancia o pérdidas de sus repeticiones, debido a fallos en el funcionamiento de los mecanismos reparadores del DNA, lo que permite que el tumor crezca por una vía diferente a la de los tumores con el fenotipo estable.

Múltiples estudios se han realizado sobre este biomarcador y su información pronóstica. Se observa que la IMS esta presente en un 15% de las neoplasias de colon esporádicos, y se ha demostrado que los pacientes que presentan la IMS, tienen una mayor supervivencia especialmente en los estadios II y III. La causa exacta de este resultado no esta del todo clara. Otro hallazgo importante es que los pacientes que presentan IMS, tienen un a mala respuesta a quimioterápicos derivados de la fluoropirimidinas, concretamente el 5-Fluoruracilo (5-FU), sin producir, por lo tanto, un claro incremento en la supervivencia por ello el uso de este agente debería estar limitado en estos pacientes y, así, evitar los efectos secundarios innecesarios. Sin embargo se requiere mayor evidencia estadística. (35,36)

- **Antígeno Carcino-Embrionario (CEA):** ya descrito previamente en el apartado de marcadores tumorales.
- **18q.** Gen de delección del CCR (DCC): Se localiza en el brazo largo del cromosoma 18 (18q) y codifica una fosfoproteína transmembrana de 190kDa. La secuencia proteica de DDC es homóloga a las moléculas de adhesión, por lo que se piensa que su mutación podría tener como resultado la pérdida de contacto entre unas células a otras, contribuyendo a

incrementar el crecimiento y potencial metastásico de los CCR. La pérdida de material de este cromosoma se encuentra en aproximadamente el 70% de los casos de CCR y en el 50% de los adenomas. (37)

Parece que la delección de esta parte del cromosoma 18 o la pérdida de detección inmunohistoquímica de la proteína DCC, es un factor predictivo de riesgo, asociado a una menor supervivencia en pacientes con CCR en estadios tumorales II y III, aunque existen estudios que no corroboran dicha teoría. Un revisión sistemática y un meta-análisis sobre este tema realizado por Popat *et al*, concluye que estos pacientes parecen tener peor pronóstico, pero afirman que se requieren estudios prospectivos utilizando una metodología más consistente para cuantificar con precisión el efecto de esta mutación en los pacientes con CCR en estadio II y III . (38,39)

- **p53:** Entre todos los potenciales marcadores predictivos, el gen p53 ha sido uno de los más estudiados, se le conoce también como el “*guardián del genoma*”. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica la producción de una fosfoproteína de 53kDa. Éste es un factor de transcripción que desarrolla un papel muy importante en la regulación del ciclo celular, ya que, de alguna forma, el p53 se sensibiliza ante el daño del ADN y detiene el ciclo celular en fase G1 y, posiblemente, también en G2, permitiendo que la reparación del material genético tenga lugar antes del comienzo de la síntesis de ADN y la mitosis; de esta forma disminuye, por lo tanto, la probabilidad de mutaciones. Si la reparación no tiene éxito o el daño es muy severo, el gen p53 puede promover la muerte celular por apoptosis, previniendo la propagación de defectos genéticos a sucesivas generaciones de células. En condiciones normales, es difícil detectar esta proteína, debido a su labilidad y vida media corta, pero cuando existe una mutación del gen se produce una proteína estructuralmente anormal, no funcionante, que se acumula en la célula (sobreexpresión) y es fácilmente evidenciada mediante análisis inmunohistoquímicos, por lo que su determinación ofrece información sobre el pronóstico en pacientes con CCR, asociándose a una evolución desfavorable debido al elevado riesgo de recurrencia postoperatoria. (40)

- **K-ras:** Éste oncogén se localiza en el cromosoma 12 y codifica una pequeña proteína de unión dependiente de GTP, que actúa como iniciadora de la señal de activación del ciclo de proliferación celular. La presencia de una mutación en este gen origina una proteína alterada que activa de forma inapropiada y persistente la señal transmembrana de transducción. Se han identificado mutaciones puntuales en el gen K-ras en aproximadamente el 40-50% de los CCR, y en el 50% de los adenomas mayores de 1 cm; mientras que la frecuencia de la mutación en los adenomas menores de 1 cm es de aproximadamente el 10%. (41)

En numerosos estudios se ha intentado determinar la importancia pronóstica de las mutaciones del gen K-ras en el CCR, y parecen indicar que el gen K-ras tiene valor pronóstico con una peor supervivencia global, aunque la mayor importancia de la detección del K-ras en la actualidad es como factor predictivo de la respuesta a Cetuximab, demostrando que la presencia de estas mutaciones que activan el gen se correlaciona con la falta de respuesta al fármaco.(42,43)

- **Timidilato Sintasa (TS):** Enzima encargada de transformar la desoxiuridina monofosfato en 2-deoxi-timidina-5-monofosfato que participa en síntesis y replicación del DNA. Niveles tumorales elevados de TS se han asociado con un mal pronóstico. Funciona también como gen diana para fármacos citotóxicos como el 5-FU. (44)
- **EGFR:** Es una proteína implicada en la cascada de señalización celular. Se ha demostrado que niveles tumorales elevados de este factor están asociados con una mayor probabilidad de recurrencia tumoral. (45)
- **Células tumorales circulantes:** la detección de estas células mediante técnicas inmunomagnéticas en la sangre periférica de pacientes con CCR se ha asociado con un peor pronóstico. (46)

Conclusión: Aunque existe esta gran variedad de marcadores moleculares para el CCR, sin embargo, a día de hoy en la literatura los resultados todavía son contrapuestos. Por ello, de momento no se pueden sacar consensos sobre su aplicabilidad clínica, no obstante muchos de ellos muestran resultados prometedores en espera de su validación para la utilización en la práctica clínica.

Los dos parámetros que a día de hoy presentan gran aceptación y uso generalizado son el CEA como factor pronóstico en el pre-operatorio y en el seguimiento; así como el K-ras para predecir la respuesta frente a Cetuximab.

Por todo esto, hoy en día nace la necesidad de crear "*perfiles de expresión*" y, así, individualizar los tratamientos según los pronósticos y la posible sensibilidad de la respuesta individual de cada paciente a los tratamientos.

### **10.3.-Recomendaciones actuales en España para utilización de Biomarcadores en el CCR.**

La alta incidencia de CCR y el alto impacto socio-económico que este produce en España ha creado la necesidad de elaboración de guías clínicas. Estas tienen el objetivo general de beneficiar a los pacientes con la optimización de la administración de sus tratamientos y, además, generar un impacto económico favorable. Por ello, se han reunido la Sociedad Española de Patología y la Sociedad Española de Oncología para la creación de un protocolo que pretende establecer con claridad y concisión cuando es necesario analizar los diferentes marcadores de susceptibilidad hereditaria del CCR, así como otros biomarcadores con carácter pronóstico y predictivo. (47)

#### **Recomendaciones:**

- Cuando por medio de los criterios clínicos de Amsterdam I y II (Tabla 6) o Bethesda se identifica a algún candidato de síndrome de Lynch, sería recomendable la determinación de los genes de reparación de errores de apareamiento (MMR), especialmente los MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 (Figura 2). (48)
- El primer escalón con estos pacientes es determinar mediante inmunohistoquímica la IMS, o falta de expresión de las proteínas producida por estos genes, y según estos resultados definir el

seguimiento específico según el riesgo de cada grupo, variando sobre todo en el tipo de prueba a realizar en el seguimiento, su periodicidad y su edad de inicio. (49)

- Recientemente, se a propuesto ampliar estas indicaciones a cualquier CCR o cáncer endometrial, ya que resulta coste efectivo, y que hasta un 10% de CCR no familiar expresan la IMS.
- Por último, existen modelos matemáticos que pueden ayudar a determinar las posibilidades de que una familia presente una mutación en los genes MMR. (50)

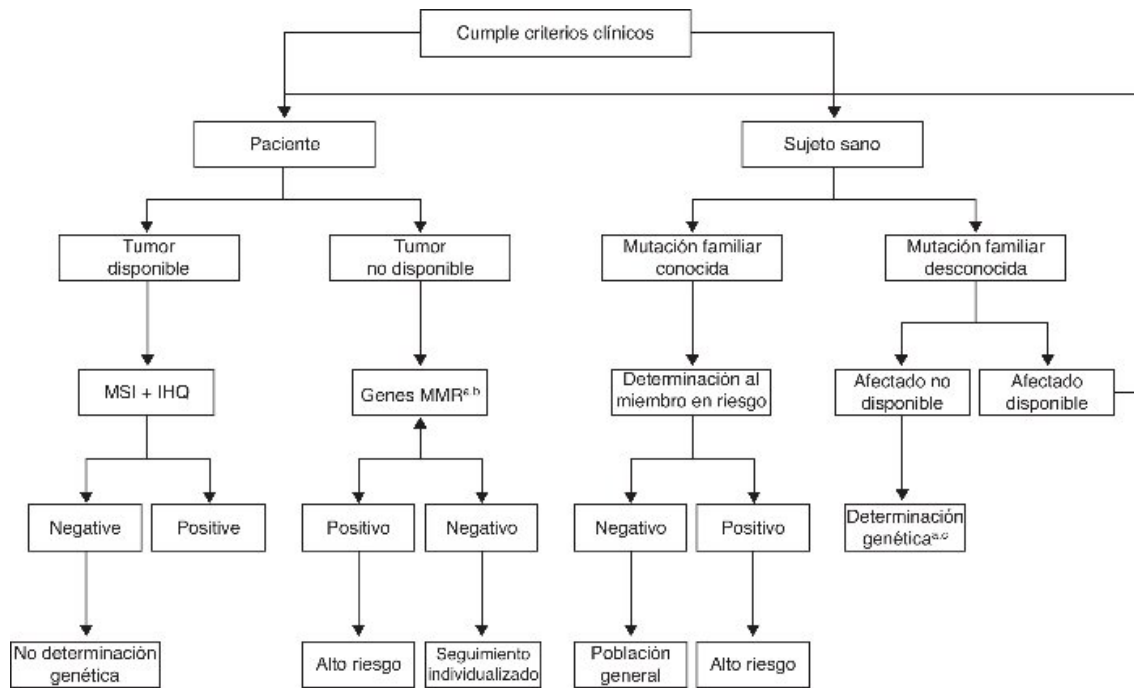
**Tabla 6:** Criterios de Amsterdam II para diagnóstico de Síndrome de Lynch.

---

## Criterios de Amsterdam I y II

---

1. Debe existir por lo menos 3 familiares con cánceres asociados a CCHNP (CCR, endometrio, intestino delgado , uréter o pelvis renal) Uno de ellos debe ser pariente en primer grado de los otros dos.
  2. Dos generaciones sucesivas afectadas.
  3. Al menos un caso diagnosticado antes de los 50 años.
  4. Se excluye la Poliposis Adenomatosa Familiar.
-



**Figura 2:** Algoritmo diagnóstico Síndrome de Lynch

**Fuente:** Algoritmo de actuación para detectar el síndrome de Lynch. (47)

a. Valorar a nivel individual. b. Cuando no haya tumor disponible pero se cumplan los criterios de Amsterdam y las implicaciones para la familia sean importantes, se debe valorar la opción de hacer un estudio de mutaciones germinales en genes MMR directamente. c. Cuando no haya afectos vivos o disponibles, se valorará hacer el estudio germinal en un sujeto sano, siempre y cuando la repercusión para el manejo de la familia sea importante. IHQ: inmunohistoquímica; MMR: genes de reparación de errores de apareamiento replicativo; MSI: inestabilidad de microsatélites

### 10.3.1.- Marcadores en CCR localizado:

- **Pérdida de heterocigosidad de 18q:** Todavía hay varios datos controversiales para poder definir a este como un biomarcador pronóstico estándar en la práctica clínica.
- **Inestabilidad de microsatélites:** Ha sido demostrado por varios estudios y suficientemente valido, que tiene un valor pronóstico especialmente con respecto a la recaída.
- **Firmas de expresión génica:** Múltiples estudios han evaluado el valor pronóstico de los perfiles de expresión, obteniendo resultados prometedores. Sin embargo, estos son estudios con limitaciones. Dos plataformas genéticas son las más desarrolladas; Oncotype Dx® de CCR, ya se comercializa en Estados Unidos que estudia por medio de transcripción

reversa de la PCR y discrimina 7 genes con valor pronóstico y 6 con valor predictivo y categoriza a los pacientes en 3 grupos (riesgo alto , moderado y bajo), aunque el valor predictivo no pudo ser validado. La otra plataforma comercial, ColoPrint®, actúa como prueba con valor pronóstico mediante micromatrices multigénicas de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), una firma de expresión de 18 genes, clasifica pacientes en riesgo alto o bajo, pero todavía pendiente de validación por estudios prospectivos aunque con resultados alentadores.

- Por lo tanto, de momento el único biomarcador validado para la utilización en la práctica clínica es la IMS. (36,47,51-53)

#### ***10.3.2.- Marcadores moleculares del CCR metastásico:***

- Múltiples estudios sobre genes como KRAS, BRAF, EGFR, PI3K y PTEN se han realizado y se puede concluir de momento que el estudio de la mutación del K-ras debe ser determinado en todos los pacientes con CCR metastásico, en los que se considere la administración de una terapia anticuerpos monoclonales anti-EGFR, como el como Cetuximab y Panitumumab. La determinación del resto de genes no debe realizarse de forma rutinaria, ya que no es necesaria para la toma de decisiones terapéuticas a día de hoy. (47,54,55)

## **11.- La Matriz Extracelular y el Desarrollo Tumoral.**

El desarrollo tumoral no sólo está determinado por las células cancerosas, sino que también juegan un papel fundamental los elementos celulares del estroma tumoral, que está formado por el conjunto de fibroblastos, células inflamatorias del propio sistema inmune y sistema de vasos sanguíneos (Figura 3). Así como también los elementos moleculares de la matriz extracelular (MEC) posee una gran influencia sobre las células de los tejidos, tanto en los tejidos de características normales, como en los patológicos e inflamatorios; su relación



permite mantener desarrollo y vitalidad de los tejido así como también la muerte celular, todo esto a través del equilibrio entre las metaloproteínas y sus inhibidores (Figura 4). La MEC es la encargada de dar la especificidad tumoral y, asimismo, se asocia a todo tipo de enfermedades. (56)

**Figura 3 :** Componentes de la Matriz Extracelular.

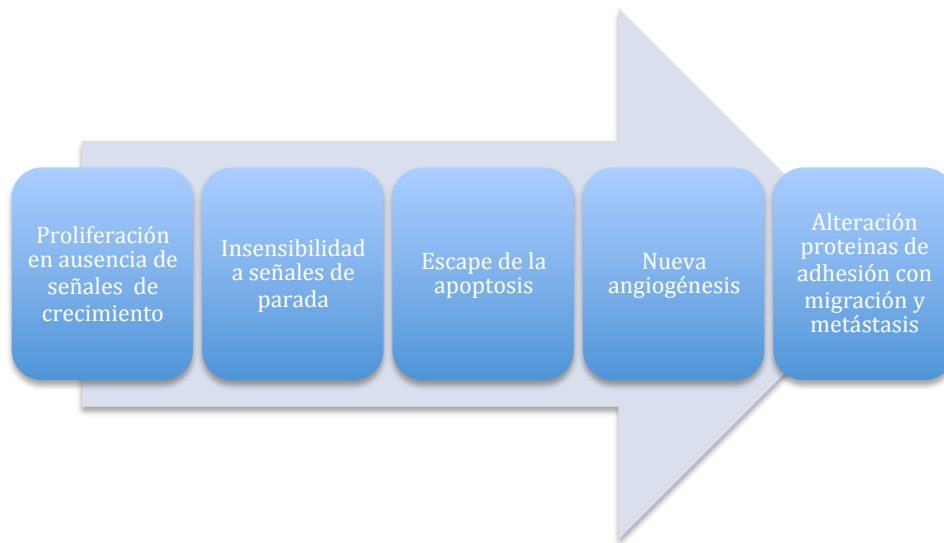
**Figura 4 :Matriz extracelular.**

Fuente: La Matriz extracelular; un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. Saavedra J., Zúñiga L., Vásquez J., et al. Morfología 2015. (157)

Últimamente, múltiples estudios han demostrando la clara relación que existe entre a la inflamación y cáncer; claros ejemplos de esto pueden ser el esófago de Barret y el cáncer esofágico, la infección por *H. Pylori* y el cáncer gástrico, infección por Papiloma Virus (HPV) cervical y cáncer de cérvix, la mayor predisposición en enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colónico, etc. (57)

Se ha observado así que a diferencia de la inflamación fisiológica; en la carcinogénesis se pierde la homeostasis, produciéndose un aumento en la secreción descontrolada por parte de las células. En fases tardías del desarrollo tumoral las células que se encuentran en la matriz extracelular presentan actividad anti-tumoral, mientras que en las etapas iniciales estos mecanismos pueden ser beneficiosos para el tumor como es el caso de los mastocitos y la neovascularización, ayudando así a los procesos oncogénicos, al crecimiento tumoral su diseminación y a desencadenar una respuesta posterior de inmunosupresión asociada. (56)

Las células tumorales adquieren nuevas características (Figura 5).



**Figura 5:** Características de las células tumorales.

### 11.1.- FIBROBLASTOS.

Los fibroblastos son las células más comunes del tejido conjuntivo, con gran capacidad de diferenciación hacia otros tejidos más especializados. Su principal función es la de mantención, cicatrización y reparación de la MEC. Estos pueden sintetizar colágeno, glucosaminoglucanos y proteínas fibrosas como la fibronectina y laminina, que son las que dan el sostén a el citoesqueleto y el tejido conjuntivo.

Nuevas evidencias y estudios demuestran que los fibroblastos son claves en la carcinogénesis, desde 1986 Dvórák lo describía como “el tumor es una herida que nunca cura” y en 2011 Hanaban y Weinberg se refieren al “*Fibroblasto asociado a cáncer*” (FAC), describiendo que este tipo celular está estrechamente relaciona con la progresión tumoral. (58)

Basándose en numerosas evidencias, esta claro ahora que el microentorno tumoral esta involucrado en las todas las etapas del desarrollo del proceso. Cuando un célula muta y adquiere su potencial tumoral se realiza una conexión estrecha con su microentorno para así poder mantener su proliferación; se cree que hay células que no logran esta compleja relación simbiótica y no pasan las barreras, quedando inactivadas y sin perpetuar su crecimiento. El conocimiento y

entendimiento más profundo de la carcinogénesis, lograría desarrollar terapias que puedan frenar esta interrelación y así la progresión tumoral. (59)

Estos acontecimientos de la degradación MEC son producidas en gran parte por enzimas proteolíticas llamadas Metaloproteinasas. Se tratan de endopeptidasas dependientes del Zinc, que se describen a continuación y son las que han despertado un nuevo interés en estudios de cara a conocer mejor el comportamiento tumoral y posibles nuevas dianas terapéuticas.

### **11.2.- METALOPROTEASAS (MMPs).**

Las metaloproteasas o metaloproteinasas son endopeptidasas secretadas por los fagocitos y el tejido conectivo. Estas enzimas son secretadas en forma latente; dentro de su estructura posee un átomo de Zinc que son los que participan en su activación, de ahí su denominación de “metalo”proteinasas.

Otra característica de las MMPs es que tienen la susceptibilidad de ser inhibidas por factores endógenos llamados “inhibidores tisulares de metaloproteasas” o TIMPs. (60)

Las MMPs fisiológicamente tienen 3 funciones básicas, que son las de:

- Mantener la estructura de los tejidos.
- Remodelación fisiológica en caso de daño.
- Coordinación entre la síntesis y degradación de los compartimentos tisulares. (61)

Se observa entonces que las MMPs juegan un papel fundamental en el proceso fisiológico de homeostasis de los tejidos; aunque nuevas líneas de investigaciones demuestran que existen en los tejidos tumorales un aumento de la expresión de las MMPs respecto al tejido normal. La acción degradativa de las MMPs es capaz de alterar las uniones intercelulares y de las células con la matriz, se produce además una activación o desactivación en los mediadores de señalización y en los receptores de superficie; produciéndose una serie de cambios que convierte a un microambiente proclive para la malignización y desarrollo del tumor y posteriormente su migración. (62)

En la literatura existe gran cantidad de publicaciones sobre estudios acerca de la relación que existe entre el desarrollo de cáncer y las MMPs; así como de sus inhibidores TIMPs, en tumores de varias localizaciones. Existe una gran variabilidad de datos pero muchos de ellos con resultados prometedores para desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y factores pronósticos y predictivos. (63)

Un reciente metaanálisis realizado por Shuaj Miao y colaboradores concluyen que en cáncer esofágico la MMP7 demuestra una clara correlación con el estadio tumoral; por lo que podría utilizarse como un biomarcador para factor pronóstico. (64)

En lo que respecta a cáncer gástrico también se ha demostrado que la sobreexpresión tumoral de las MMP7 y TIMP2 se asocia a un peor pronóstico de los pacientes. (65)

El cáncer de mama es uno de los campos en que tiene mayor aplicación la investigación de las MMPs; por ejemplo, el grupo de Vizoso y colaboradores, describe que, según la expresión de MMPs y TIMPs en el estroma, se puede clasificar a los pacientes en subgrupos y, así, tener una mejor evaluación pronóstica, por lo tanto una mejor decisión terapéutica. (66)

Este mismo grupo de investigación describen que en el Hepatocarcinoma el microentorno tumoral, con sus células inflamatorias y fibroblastos con la expresión MMPs y TIMPs, son promotores de mecanismos tumorales como la angiogénesis, crecimiento e invasión; por lo que la caracterización de la matriz extracelular puede dar gran información pronóstica. (67,68)

Otras investigaciones hablan de la posibilidad de aislar anticuerpos que actuarían de manera selectiva contra MMPs de mal pronóstico, con lo que se abriría un nuevo camino para la mejoría de los tratamientos al ser más dirigidos; estudios experimentales en ratones muestran que el bloqueo de las MMPs pueden disminuir la capacidad invasiva de las metástasis. (69,70)

Dentro de los estudios en patología colónica hay estudios como el de Vizoso *et al* que concluye que las MMPs y TIMPs tienen un papel fundamental en el desarrollo tanto de cáncer, como en el desarrollo de pólipos y en la enfermedad inflamatoria intestinal. Así también, estudios demuestran que en los tumores colónicos el aumento de la expresión de MMP11 y 13 por los fibroblastos del estroma se asocian a un peor pronóstico con menor tasa de supervivencia. (71,72)

### **11.3.- RECEPTOR TIPO TOLL O “TOLL LIKE RECEPTOR” (TLR).**

Los TLRs son proteínas transmembranas que forman parte del sistema inmunitario innato, que esta encargado en reconocer agentes infecciosos o extraños y desencadenar una cascada, con activación de la respuesta inflamatoria en los leucocitos e incremento de moléculas estimuladores; existen 13 miembros de la familia de TLRs reconocidos. (73)

Los TLRs tienen una distribución tisular muy amplia, estos pueden reconocer moléculas derivadas de los tejidos lesionados del huésped y desencadenar respuestas no solo inmunes sino también metabólicas y de comportamiento propias de los estados de enfermedad. De acuerdo con estas observaciones, es posible considerar a los TLR como receptores de señales de peligro, tanto exógenas como endógenas; y, por tanto, como un puente entre la teoría del reconocimiento de lo no propio infeccioso y la teoría del peligro, lo cual plantea una serie de repercusiones progresivas importantes que van más allá de la respuesta inmune. (74)

Existen dos vías de activación, la una mediada por MyD88, y la segunda independiente de MyD88. Posteriormente, se produce una activación de factores como interferón, y factor nuclear KB, entre otros, que luego producirán citoquinas que continúan y aumentan el estado reactivo de la respuesta autoinmune, de la inflamación crónica y de las enfermedades infecciosas; con el reconocimiento de las secuencias moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

La teoría del Modelo del Peligro se trata básicamente en una visión de los TLRs en la que propone que la respuesta inmune puede inducirse no sólo por el encuentro con un antígeno; sino también por cualquier circunstancia de peligro; es decir, que además de reconocer moléculas de microorganismos “no propios”, los TLR también detectan la “pérdida de lo propio” al reconocer moléculas asociadas a “Peligro” presentes en células infectadas o dañadas por medios no apoptóticos. (75)

Los TLRs están asociados a la sensibilidad infecciosa, alérgica e inflamatoria, así como al cáncer. La identificación de los TLRs ha revolucionado el campo de la inmunología. Un entendimiento completo de los mecanismos de la

inmunidad innata podría ayudar para la manipulación de enfermedades infecciosas, cáncer y alergias, entre otras. (76)

La evidencia sugiere que un mal funcionamiento de los TLRs contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, tuberculosis, pancreatitis, enterocolitis necrotizante, aterosclerosis, entre otros. (77-79)

### **11.3.1.- Tratamientos y aplicación clínica de los TLRs:**

Los TLRs son promotores de defensas, por lo que sus antagonistas pueden ser el objetivo diana para tratamientos en enfermedades inflamatorias y autoinmunes en las que están involucrados. Paradójicamente se ha observado una sobreexpresión de TLRs en múltiples tumores; por lo que varios estudios demuestran que los TLRs pudieran tener un papel en el crecimiento del tumor y la evasión del mismo frente a las defensas del huésped. Los TLRs se podrían utilizar para mejorar la efectividad del reconocimiento de los antígenos, así como también el uso de sus antagonistas para una posible forma de ataque a las células tumorales. Se ha demostrado que hasta un 25% de todos los tumores son debidos a la asociación de inflamación crónica y cáncer. Las células cancerígenas adquieren una capacidad para sobrepasar los límites de supervivencia y proliferación, inactivando a los genes supresores; todo esto debido a un soporte del estroma normal que rodea al tumor.(80,81)

### **11.3.2.- TLR4 en CCR:**

Se ha demostrado que los TLRs están implicados en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal; y aunque todavía hay muchos puntos por aclarar en la asociación de inflamación crónica y la aparición de CCR, estudios en pacientes con Colitis Ulcerosa demuestran que los TLR4, podrían promover el desarrollo cancerígeno y, probablemente, su inhibición sería un factor protector. (82)

Otros estudios que comparan pacientes con adenomas, colitis ulcerosa y adenocarcinoma, nos muestran que existe una mayor expresión de TLR4 en las células del epitelio y del estroma, así como los mediadores de las vías inflamatorias y angiogénicos durante la progresión hacia el cáncer colorrectal; sugiriendo así a

estos como marcadores de progresión de la enfermedad en pacientes con lesiones pre-malignas hacia neoplasia. (83,84)

Por otro lado, el grupo de Vizoso ha demostrado que la expresión de los TLR4 por las células tumorales en el CCR, está asociado a una menor recurrencias tumoral, mientras que, si es expresado por los fibroblastos se asocia independientemente a una mayor recurrencia y menor supervivencia, por lo que podría tener utilidad como un marcador de pronóstico. (85)

Otros estudios en el CCR demuestran que el incremento del TLR4, MYD88 y de IL6, están asociados a mayor número metástasis hepáticas y es un factor independiente en el pronóstico de CCR; mientras que la deficiencia de TLRs es un factor protector. (86)

### **11.3.3.- Aplicación terapéutica de los TLRs:**

Los TLRs ahora se han convertido en objetivo importante para el tratamiento de enfermedades infecciosas, terapia con vacunas y tratamiento del cáncer, debido a su gran capacidad para la presentación de antígenos y de desencadenar la respuesta innata y adaptativa. Últimamente, la evidencia demuestra que los TLRs se expresan en una gran variedad de tumores, sugiriendo estos datos que tienen implicación en la biología tumoral, promoviendo la proliferación, resistencia a la apoptosis, invasión celular y metástasis que, a su vez, es regulada por las MMPs e integrinas. Sin embargo, algunos estudios demuestran que los TLRs bajo diferentes condiciones pueden mostrar un efecto contrario; por un lado, podrían promover la apoptosis, aunque también bajo otras condiciones ayudan a la supervivencia de la célula, al crecimiento tumoral e inclusive a la resistencia contra la terapia anti-tumoral. Estos hallazgos sugieren que los TLRs se podrían utilizar como agonistas o antagonistas en terapia anticancerígena, aunque de momento son necesarios más estudios sobre TLRs en condiciones normales y otros en células mutadas. (87-90)

Hoy en día, la asociación de inmunidad y cáncer han adquirido mucho interés en los investigadores, estudios sugieren que ciertos perfiles de expresión podrían servir de guía para el diagnóstico específico de cáncer, la predisposición



de los pacientes en desarrollar tumores y predecir su comportamiento, su sensibilidad o resistencia a las terapias anti-tumorales. (91-93)

El uso combinado de un antígeno aislado del tumor y los TLRs de forma agonista o antagonista podrían servir como vacuna y, así, anticipar el efecto de proliferación aumentando la autoinmunidad contra el cáncer. Aunque es necesaria todavía más investigación para conocer en detalle el comportamiento de cada TLR y sus vías en cada tipo tumoral, por lo que estas opciones terapéuticas se encuentran todavía en una etapa inicial de la investigación y queda mucho por desarrollar. (94)

## **12.- Inmunoterapia.**

La inmunoterapia cobra un gran interés en 1998 cuando Ohtani y colaboradores demuestran la que presencia de Linfocitos T CD8+ (citotóxicos) en el microambiente tumoral se correlacionan con un mejor pronóstico en el CCR; lo que inició investigaciones sobre esta línea, actualmente existen 7 categorías:

1. **Anticuerpos Monoclonales:** son moléculas generadas en laboratorio para poder atacar a antígenos específicos de los tumores. Actualmente existen múltiples ensayos clínicos en desarrollo para nuevas terapias monoclonales.
2. **Control de Inhibidores e Inmunomoduladores:** las citocinas son proteínas de señalización que intervienen y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. El objetivo es un control de la respuesta inmune y producen un bloqueo de las moléculas inhibitoras y una estimulación de las moléculas activadoras de la respuesta inmune.
3. **Vacunas:** consiste en la inoculación de antígenos asociados al cáncer para aumentar la reacción inmunitaria. Existen vacunas con antígenos que se encuentran en varios tipos de células cancerígenas, otras que serían específicas para cada especie de cáncer, y unas terceras que serían individuales para cada tipo de tumor y cada individuo. Se están desarrollando en ensayos clínicos vacunas que incluyen como dianas el CEA, MUC1, Guanilil ciclasa C y NY-ESO-1.

4. **Terapia adoptiva de transferencia de Linfocitos T:** se trata de una terapia experimental donde se cultivan los linfocitos T citotóxicos extraídos del tumor de cada paciente, se realiza manipulación genética de ellos en laboratorio para incrementar su actividad y se reintroducen nuevamente en el paciente. De esta forma, los nuevos linfocitos T modificados se adhieren al tumor para su destrucción. De momento esta línea se estudió ampliamente en el melanoma metastásico, aunque ya se iniciaron estudios en tumores sólidos que se encuentran en Fase I y II.
5. **Terapia de Vírica Oncolítica:** consiste en la introducción de virus modificados que producen su adherencia y multiplicación en las células tumorales, sin causar un gran efecto en las células normales. De momento, no ha sido aprobado su uso en Estados Unidos. En China un adenovirus modificado fue utilizado para tumores de cabeza y cuello. Ahora se encuentra en Fase II de ensayos clínicos.
6. **Adyuvantes Inmunoterápicos:** son sustancias que tienen la finalidad de aumentar la respuesta autoinmune y se utilizan solas o combinadas con otras inmunoterapias.
7. **Citoquinas:** Son moléculas mensajeras que ayudan al crecimiento y actividad de las células del sistema inmune.

La mayoría de estas terapias están en fases de ensayos clínicos y pendientes de aprobación definitiva.(95,96)

### **III.HIPÓTESIS Y OBJETIVO.**

## **1.-Hipótesis de trabajo.**

El cáncer colorrectal hoy en día se ha convertido en un importante problema de salud pública debido a su incidencia y la elevada morbimortalidad que este produce. Ocupa la tercera causa de muerte en España; su tratamiento se basa en resección endoscópica, cirugía, quimioterapia y/o radioterapia según el caso.

El pronóstico y tratamiento de los pacientes con CCR, se basa principalmente en criterios clínicos y hallazgos anatomopatológicos; hecho que resulta insuficiente ya que se puede estadificar en un mismo grupo a pacientes que tendrán un desarrollo de la enfermedad y respuesta al tratamiento totalmente diferente, ya que existe otro importante factor que es el comportamiento de las células tumorales, y eso hace el que cambie el pronóstico en cuanto a porcentajes de recurrencia tumoral y supervivencia. Aunque en proceso de investigación, todavía no existen factores predictivos y pronósticos validados que nos ayuden a evaluar el comportamiento individualizado de cada paciente. En el estadio II del cáncer de colon todavía existe controversia en el tratamiento adyuvante; ya que no está claro en quienes este tratamiento podría ser beneficioso dada su alta posibilidad de recurrencia y, a su vez, en quienes se podría prescindir de su aplicación por tener un beneficio muy escaso y, así, evitar los graves y perjudiciales efectos secundarios.

Existen numerosos artículos en la literatura sobre las MMPs, TIMPs y TLRs en relación con el cáncer en general, y con el colorrectal en específico, que sugieren un papel relevante de estas proteínas en la biología tumoral y su posible factor pronóstico y predictivo.

Por lo que este trabajo tiene entre sus objetivos, el evaluar los factores de inflamación, MMPs y TLRs, entre los grupos de pacientes operados con cáncer colorrectal estadio II. De esta forma se pretende intentar identificar un posible factor pronóstico que pueda contribuir a individualizar mejor la estrategia en el tratamiento y seguimiento.

## 2.-Objetivos.

- Estudiar la expresión global de factores relacionados con la carcinogénesis y la inflamación; Metaloproteasa (MMP)-11, MMP-13 y Receptor tipo Toll (TLR) 4, en las muestras tumorales de los pacientes con neoplasia de colon estadio II operados.
- Medir las expresiones de MMP-11, MMP-13 y TLR4 por cada uno de los distintos tipos celulares (células tumorales, fibroblastos, células mononucleares inflamatorias) de los tumores.
- Evaluar las posibles diferencias en las expresiones de las MMP-11, MMP-13 y TLR4, entre el grupo de pacientes que se observó recurrencia tumoral local y/o metastásica *versus* el grupo que permanecieron libres de enfermedad.
- Realizar un análisis de supervivencia y posible asociación entre el pronóstico de los pacientes y la expresión MMP-11, MMP-13 y TLR4.

## **IV.MATERIAL Y MÉTODO.**

## **1.-Diseño del estudio.**

Se trata de un estudio analítico, observacional de casos y controles en el que se incluyen a pacientes con diagnóstico y operados de cáncer de colon en estadio II según la clasificación de la AJCC 7ma edición.

## **2.- Aspectos éticos.**

Todos los pacientes han sido tratados bajo las normas de la ley de protección de datos, firmaron un consentimiento informado previo y el estudio fue aprobado por el comité de investigación del Hospital de Cabueñes y de la Fundación Hospital de Jove, donde se realizó el estudio.

## **3.- Pacientes.**

Se seleccionaron los pacientes diagnosticados y operados con cáncer de colon estadio II, basándose en dos muestras; una procedente del Hospital de Cabueñes (Área Sanitaria V, Gijón-España) operados entre los años 2005 - 2015, y una segunda, de un grupo de pacientes procedente de una muestra histórica de la Fundación Hospital de Jove (Área Sanitaria V, Gijón-España) entre los años 1981 - 1992 (72,85); tabla 7.

### **3.1.- Criterios de Inclusión de los pacientes.**

- Pacientes con neoplasia de Colon en estadio II confirmados por la anatomía patológica posterior.
- Haberse sometido a cirugía con intención curativa.
- En el caso de los pacientes sin recurrencia, deberá de existir un seguimiento igual o mayor a 60 meses (5 años).
- Que la cirugía realizada cumple los criterios oncológicos .
- Se incluyen cirugía por laparotomía y laparoscopia.

### **3.2.- Criterios de Exclusión de los pacientes.**

- Pacientes con tumores sincrónicos o metacrónicos con un mayor estadio.
- Cáncer de Recto.
- Cirugía donde no se cumplan los criterios oncológicos (número de ganglios menor de 12, resección incompleta del tumor, márgenes tumorales no adecuados).
- Antecedentes de neoplasia de colon operada.
- Quienes recibieron tratamiento neoadyuvante.
- Pacientes diagnosticados previamente de otra neoplasia.



**Tabla 7:** Características clinicopatológicas de los 96 pacientes con Cáncer de Colon Estadio II.

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>N (%)</b>
Pacientes totales	96
Hospital de Cabueñes	57 (59,3)
Hospital Fundación de Jove	39 (40,6)
<b>Edad</b> (mediana)	68,5
<b>Sexo</b>	
Masculino	46 (47,9)
Femenino	50 (52,1)
<b>Grado Histológico</b>	
Bien diferenciado	25 (26)
Moderadamente diferenciado	68 (70,8)
Pobremente diferenciado	1 (1)
No consta	2 (2)
<b>Recurrencia</b>	
Si	45 (46,9)
No	51 (53,1)
<b>Tipo de Recurrencia</b>	
Local	21 (21,9)
Distancia	29 (30,2)
Metástasis Hepáticas	16 (16,7)
Metástasis Pulmonares	11 (11,5)
Metástasis Cerebrales	1 (1)
Metástasis Óseas	1 (1)
Carcinomatosis	10 (10,4)
<b>Muerte por Cáncer</b>	28 (29,1)
<b>Tratamiento Adyuvante</b>	
No	90 (93,8)
Si	6 (6,3)
<b>Localización Tumoral</b>	
Colon Derecho	36 (37,5)
Colon Transverso	7 (7,3)
Colon izquierdo	52 (54,2)
Derecho/Sigma	1 (1)

## **4.- Manejo de la muestras.**

Se recolectaron las muestras conservadas en bloques de parafina del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Cabueñes y la Fundación Hospital de Jove; luego se realizaron los demás procesos de análisis en la Unidad de Investigación de este último (Gijón España).

### **4.1.- Técnica de elaboración de Mallas de tejido y tinción Inmunohistoquímica.**

Con el fin de determinar la expresión de MMP-11, MMP-13 y TLR-4, en las muestras de tejido de cada uno de los pacientes del estudio, se han elaborado unas mallas de tejido o *arrays* de tejido. De esta forma, se pueden procesar 32 muestras de pacientes simultáneamente.

Las muestras de los tejidos se fijaron en formol tamponado al 4% durante un mínimo de 24h. Tras esto, se realizó el estudio macroscópico y se incluyeron en parafina las secciones más representativas para el diagnóstico anatómico-patológico. Para su inclusión, se realizó el siguiente proceso: formol 15' - Alcohol 70° 30' - 96° 30' - 96° 30' - 100° 30' - 100° 30' - 100° 45' - xilol 60' - xilol 60'.

Tras la obtención de los bloques de tejido y con la ayuda de un micrótopo (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) se realizaron cortes con un grosor de 5µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina de cara a confirmar la presencia de tejido tumoral. Posteriormente se elabora el *array* mediante un *manual tissue microarray* (Modelo MTA-1, Beecker instruments, Sun Praerie, Wisconsin, USA). El procedimiento consiste en extraer uno a uno los cilindros de parafina del bloque receptor, rellenando el bloque en blanco con el tejido extraído del bloque donante. Al mismo tiempo se realiza una plantilla indicando la situación de cada uno de los casos, así como el número de biopsia correspondiente.

Una vez terminado el *array* se lleva a la estufa a 60°C durante 10' para la correcta unión de los cilindros al bloque de parafina. Para el corte del *array*, éste se enfría previamente a 4°C. Los cortes se realizan en el microtopo obteniéndose secciones de 5µm de grosor. Los cortes son recogidos en portaobjetos pretratados para el uso en el inmunoteñidor.



**Figura 6:** Elaboración de *array* mediante “*manual tissue array*”.



**Figura 7:** Tinción Inmunohistoquímica realizada sobre un array.

Sobre estas laminillas se realizó el estudio inmunohistoquímico, utilizando anticuerpos específicos frente a MMP-11, MMP-13 y TLR-4.

Antes de la inmunotinción se realiza el desparafinado y el desenmascaramiento antigénico de los anticuerpos.

Los anticuerpos usados en este proyecto han necesitado un desenmascaramiento antigénico o pre-tratamiento con calor. Este pre-tratamiento se realizó con el sistema automatizado PT-Link (Dako, Glostrup, Dinamarca), el cual consta de 2 tanques con diferentes soluciones de recuperación antigénica. Uno a pH9, compuesto por una solución de Tris-EDTA (Targer Retrieval Solution, Dako) y el otro a pH6 compuesto por un tampón citrato (Target Retrieval Solution, Dako). Se usa uno u otro tratamiento dependiendo de las características del anticuerpo

primario. Este sistema lleva al calentamiento de la laminilla a 95°C durante 20 minutos, atemperándose posteriormente hasta 65°C. Finalmente, las secciones se mantuvieron un mínimo de 5 minutos en tampón de lavado, en ambos casos.

Una vez tengamos las laminillas con los cortes fijados, desparafinados y con el desenmascaramiento antigénico, comienza la tinción automática. Los cortes se introdujeron en las bandejas especiales del Auto-Stainer Dako (teñidor automático), donde se realizó la técnica de inmunohistoquímica siguiendo estos pasos: a) lavado en tampón; b) bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos; c) incubación con el anticuerpos primarios, el tiempo de esta incubación depende del anticuerpo usado (Tabla 8); d) el exceso de anticuerpo se elimina con tampón de lavado (Wash Buffer, Dako); e) incubación de los cortes con el sistema de polímeros de dextrano durante 30 minutos (Envision™ Detection Kit, Dako). Este sistema de polímeros de dextrano se basa en la utilización de un polímero de alto peso molecular, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de peroxidasa y anticuerpo secundario (inmunoglobulinas anti-ratón/conejo); g) lavados con tampón; h) la visualización del marcaje inmunohistoquímico se realiza con tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) (Dako) durante 7 minutos y 30 segundos; i) contratinción con hematoxilina de Harris durante 2 minutos; j) las muestras se lavan, se deshidratan con alcoholes de concentraciones crecientes y xilol, y se montaron con HistoLab (Pertex®) y cubreobjetos. Por último se observaron al microscopio óptico Olympus Bx51 a 400x.

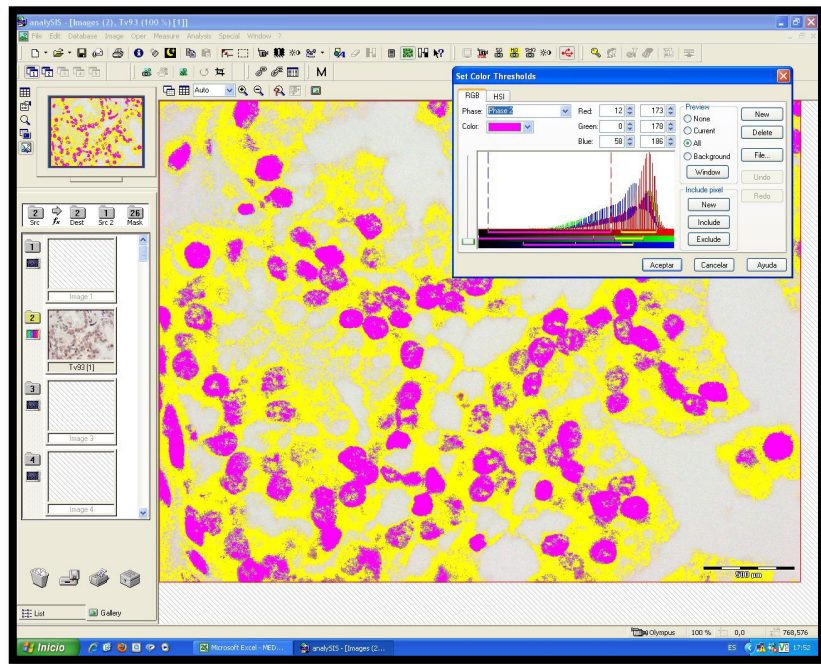
**Tabla 8:** Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante inmunohistoquímica .

<b>Anticuerpo</b>	<b>Pretratamiento</b>	<b>Dilución</b>	<b>Incubación (min)</b>	<b>Casa comercial (Nº Cat)</b>
<b>MMP-11</b>	pH6	1:400	60	Thermo (MA1-26627)
<b>MMP-13</b>	pH9	1:50	120	Thermo (MA5-14238)
<b>TLR-4</b>	pH6	1:40	45	Santa Cruz (SC-10741)

#### **4.1.- Análisis de las Tinciones.**

Para cada anticuerpo, se estudió la localización de la inmunoreactividad, el porcentaje de células teñidas y la intensidad de tinción de cada muestra. Para ello se utilizó en sistema de análisis de imagen que consta de un microscopio (Olympus BX51) acoplado a una cámara fotográfica y un programa adaptado al mismo (analySIS, soft Imaging System, Münster, Alemania), para cuantificar el área teñida de cada muestra.

Manualmente se selecciona el área teñida por el anticuerpo (que se verá marcada en marrón y el software lo representa de color amarillo) y la zona teñida por la hematoxilina (representa a los núcleos, el software lo representa en color rosa) (Figura 8).



**Figura 8:** Sistema de análisis de imagen y de tinción.

Se obtuvo de cada campo un porcentaje de área teñida. Este porcentaje es el resultante de la relación entre el área teñida por el anticuerpo (en amarillo) y el área no teñida (en rosa).

En los *arrays* de tejido se han hecho 2 cilindros para cada paciente, y de cada cilindro se obtienen 2 medidas en distintas áreas, así pues, de cada paciente se hace la media de los 4 porcentajes.

Para cuantificar la intensidad de tinción se sigue la siguiente escala numérica del cero al tres reflejando 0 la ausencia de tinción; 1 una tinción débil; 2 una tinción intermedia y 3 una tinción intensa.

Por último, se calcula el valor de tinción; es decir, la expresión global o *score* de la tinción, mediante una hoja de cálculo, multiplicando la intensidad de la misma por el porcentaje de área teñida.

#### **4.2.- Análisis de datos y métodos estadísticos.**

Las diferencias en porcentajes fueron calculadas con la prueba Chi-cuadrado. Los valores de tinción de cada proteína fueron expresados en forma de mediana con un intervalo mínimo y máximo. La comparación de los valores de tinción entre los grupos fue realizada con la pruebas no paramétricas, como son *Mann-Whitney* o *Kruskall-Wallis* para muestras independientes. Para los análisis de supervivencia libre de enfermedad se utilizó el método de Cox univariante.

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las inmunotinciones, se utilizó el programa estadístico PASW 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el valor de  $p$ , fue igual o inferior a 0,05.

## **V.RESULTADOS.**



## **1.- Casos perdidos.**

A lo largo de la realización del estudio, en unos pocos casos no se ha logrado la obtención de los resultados de las tinciones de inmunohistoquímica para los factores analizados. Ello ha sido debido a la ausencia de muestra tisular suficiente para realizar todas las determinaciones necesarias. A estos resultados se les ha denominado “casos perdidos”. Hemos de recordar que las muestras para el estudio provenían de piezas de resección de intervenciones quirúrgicas, con lo cual han sido ya utilizadas por el servicio de Anatomía Patológica para su correcto diagnóstico. En la Tabla 9, se enumeran los casos válidos y perdidos para cada determinación.

**Tabla 9:** Casos válidos y perdidos del estudio de la expresión global y por tipo celular.

	Válidos	Perdidos
<b>MMP11 (score)</b>	93	3
<b>MMP13 (score)</b>	92	4
<b>TLR4 (score)</b>	92	4
<b>MMP 11 CT</b>	93	3
<b>MMP11 FIB</b>	93	3
<b>MMP11 CMI</b>	93	3
<b>MMP13 CT</b>	92	4
<b>MMP13 FIB</b>	92	4
<b>MMP13 CMI</b>	92	4
<b>TLR4 CT</b>	92	4
<b>TLR4 FIB</b>	92	4
<b>TLR4 CMI</b>	92	4

CT: Célula tumoral, FIB: Fibroblastos, CMI: Célula mononuclear inflamatoria.

## 2.- Expresión global de MMP11, MMP13, TLR4.

Uno de los objetivos del estudio ha sido determinar la expresión global (*score*), en las muestras obtenidas de los pacientes con cáncer de colon estadio II. En la Tabla 10, se muestra la expresión global de los tres factores a estudio, en función de su mediana, describiendo también el intervalo mínimo y máximo de su expresión; se puede observar que existe una mayor expresión de MMP11, seguida de la expresión de TLR4 y en menor medida la MMP13.

**Tabla 10:** Expresión global de MMP11, MMP13 y TLR4.

	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>MMP11</b>	118,82	0,00	293,05
<b>MMP13</b>	75,17	0,00	179,95
<b>TLR4</b>	107,02	0,00	240,62

### 3.- Expresión de MMP11, MMP13 y TLR4 por distintos tipos celulares.

Otro de los objetivos principales del estudio, ha sido evaluar la expresión por los diferentes tipos celulares: células tumorales (CT), fibroblastos (FIB), y por las células mononucleares inflamatorias (CMI). En la Tabla 11, observamos que existe más variabilidad de expresión de los factores del estroma (fibroblastos y células mononucleares inflamatorias) y una mayor expresión por las células tumorales.

**Tabla 11:** Expresión de MMP11, MMP13 y TLR4 por tipo celular.

	<b>Célula</b>	<b>Fibroblasto</b>	<b>C.M.I.</b>
	<b>Tumoral N° (%)</b>	<b>N° (%)</b>	<b>N° (%)</b>
<b>MMP11</b>	92 (95,8)	50 (52,1)	19 (19,8)
<b>MMP13</b>	76 (79,2)	85 (88,5)	26 (27,1)
<b>TLR4</b>	85 (88,5)	23 (24)	23 (24)

#### **4.- Relación de la expresión de los factores con las características clínico patológicas de los pacientes.**

##### **a) Expresión global.**

Al comparar la relación entre la expresión global de MMP11, MMP13 y TLR4, y las características clínico patológica de los pacientes, mediante la prueba de U Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para muestras independientes, se demostró (Tabla 12), de que existe una relación estadísticamente significativa entre la edad y la expresión global (*score*) de TLR4. Se observó que los pacientes de edad más avanzada mostraron valores más elevados de expresión global de TLR4.

**Tabla 12:** Relación entre la expresión global de MMP11, MMP13 y TLR4 y las características clínico patológicas.

<b>Característica</b>	<b>Mediana Score (intervalo) MMP11</b>	<b>Mediana Score (intervalo) MMP13</b>	<b>Mediana Score (intervalo) TLR4</b>
<b>Edad</b>			<b>p: 0,01</b>
≤ 68,5 años	113,51 (32-293)	72,31 (0-149)	96,5 (0-194)
≥ 68,5 años	126,12 (0-254)	80,1 (0-179)	117,43 (0-240)
<b>Sexo</b>			
Hombre	116,10 (0-256)	81,36 (0-179)	109,08 (0-240)
Mujer	132,09 (39-293)	71,88 (0-173)	98,70 (0-215)
<b>Recurrencia</b>			
Si	126,48 (39-284)	80,10 (0-179)	110,37 (0-216)
No	109,04 (0-293)	67,66 (0-150)	103,60 (0-240)
<b>Grado de diferenciación Histológica</b>			
Bien diferenciado	109,56 (0-226)	81,36 (0-179)	105,54 (0-210)
Moderadamente diferenciado	126,85 (32-284)	72,99 (0-158)	106,36 (0-240)
Poco diferenciado	293,05 (0-293)	0 (0-0)	-
<b>Localización Tumoral</b>			
Colon Derecho	117,66 (36-219)	73,67 (0-173)	97,93 (0-240,62)
Colon Transverso	120,03 (53-158)	119,04 (0-138)	117,27 (15-186)
Colon izquierdo	127,19 (0-293)	71,88 (0-179)	107,79 (0-216)
Colon Derecho / Sigma	100,58 (100,58)	91,64 (91,64)	134,16 (134,16)

### **b) Expresión por tipo celular.**

Al comparar las características clínico-patológicas de los pacientes con la expresión por tipo celular mediante la prueba de Chi cuadrado, se demostró que existe una relación entre la expresión de TLR4 por las células tumorales y la recurrencia global (Tabla 13). El resto de características como: sexo, grado de diferenciación histológica, localización tumoral; no demostraron relación significativas.

**Tabla 13:** Relación entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4 por tipo celular y las características clínico patológicas

	MMP11			MMP13			TLR4		
	CT	FIB	CMI	CT	FIB	CMI	CT	FIB	CMI
<b>Edad</b>									
≤ 68,5 años	46(49%)	27(29%)	13(13%)	36(39%)	3(3%)	13(14%)	40(43%)	9(9%)	11(11%)
≥ 68,5 años	46(49%)	23(24%)	6(6%)	40(43%)	4(4%)	13(14%)	45(48%)	14(15%)	12(13%)
<b>Sexo</b>									
Hombre	42 (45%)	23(24%)	10(10%)	38(41%)	5(5%)	15(16%)	42(45%)	10(10%)	12(13%)
Mujer	50 (53%)	27(29%)	9(9%)	38(41%)	2(2%)	11(11%)	43(46%)	13(14%)	11(11%)
<b>Recidiva</b>	<b>p: 0,043</b>								
Si	44(47%)	28(30%)	8(8%)	37(40%)	40(43%)	13(14%)	39(42%)	12(13%)	9(9%)
No	48(51%)	22(23%)	11(11%)	39(42%)	45(48%)	13(14%)	46(50%)	11(11%)	14(15%)
<b>Grado de diferenciación</b>									
Bien diferenciado	22(24%)	12(13%)	6(6%)	18(20%)	1(1%)	9(10%)	26(28%)	6(6%)	8(8%)
Moderadamente diferen.	67(73%)	37(40%)	12(13%)	56(62%)	6(6%)	17(18%)	60(66%)	17(18%)	15(16%)
Poco diferenciado	1(1%)	1(1%)	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	-	-	-
<b>Localización Tumoral</b>									
Colon Derecho	34(36%)	17(18%)	6(6%)	27(29%)	3(3%)	10(10%)	29(31%)	10(10%)	8(8%)
Colon Transverso	6(6%)	4(4%)	0(0%)	5(5%)	1(1%)	2(2%)	7(7%)	1(1%)	0(0%)
Colon izquierdo	51(54%)	29(31%)	13(13%)	43(46%)	3(3%)	14(15%)	48(52%)	11(11%)	15(16%)
Colon Derecho / Sigma	1(1%)	0(0%)	0(0%)	1(1%)	0(0%)	0(0%)	1(1%)	1(1%)	0(0%)

## 5.- Relación de la expresión de los factores con la recurrencia global.

Se realizó el análisis sobre la expresión global y por tipo celular de los factores, MMP11, MMP13 y TLR4; y su relación con la recurrencia tumoral global, en los pacientes operados por carcinoma de colon estadio II. Considerándose como recurrencia global, a la recurrencia tumoral tanto local, como a distancia.

### a) Expresión global:

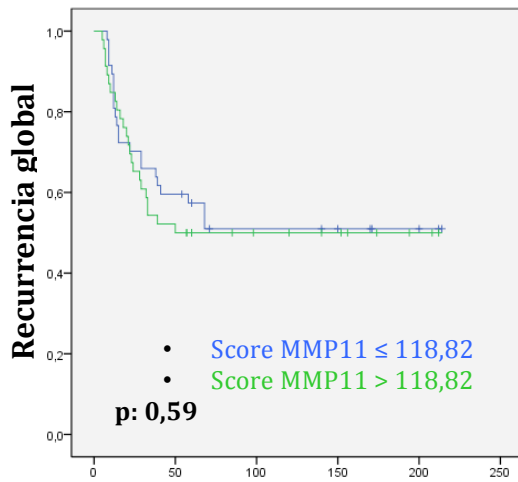
En la Tabla 14 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según la mediana del *score*.

No se ha encontrado relaciones significativas entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4, con la recurrencia global. Figura 9, 10 y 11.

**Tabla 14:** Relación entre la expresión global (*score*) de MMP11, MMP13, TLR4, y el número de eventos de recurrencia tumoral global.

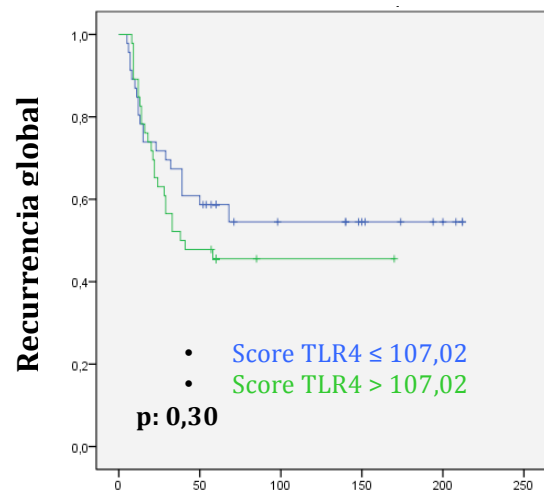
<b>Factor</b>	<b>Mediana Score</b>	<b>N° Total</b>	<b>N° Eventos (%)</b>
<b>MMP11</b>	≤ 118,82	47	21 (44,6)
	> 118,82	46	23 (50)
<b>MMP13</b>	≤ 75,17	46	20 (43,4)
	> 75,17	46	23 (50)
<b>TLR4</b>	≤ 107,02	46	20 (43,4)
	> 107,02	46	25 (54,3)





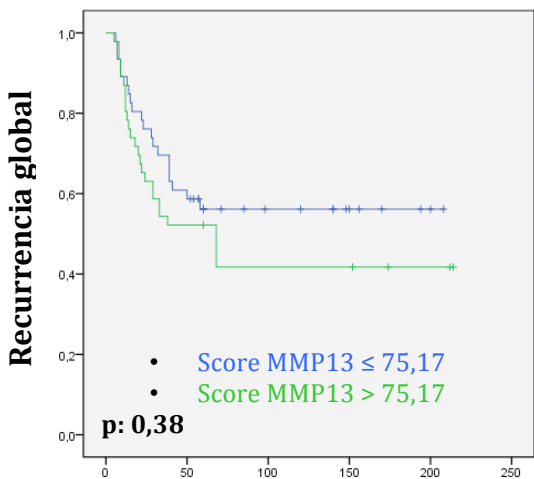
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 9:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de la mediana del score de MMP11.



**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 11:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de la mediana del score de TLR4.



**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 10:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de la mediana del score de MMP13.

## b) Expresión por tipo celular:

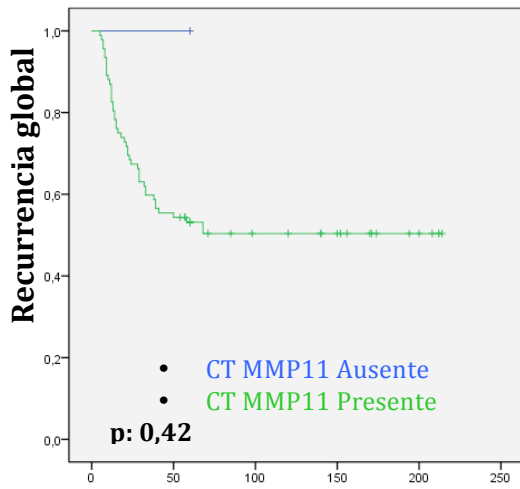
En lo que respecta al análisis de la expresión por tipo celular; se muestra en la Tabla 15 el resume de casos en los que se observó la expresión de los factores.

No se observó significación estadística en MMP11 y MMP13 (Figuras 12 y 13); sin embargo, sí existió una relación estadísticamente negativa entre la expresión de TLR4 por células tumorales y la recurrencia global. (Figura 14.)

En cuanto a la expresión por tipos celulares de fibroblastos y células mononuclear inflamatorias, podemos ver en las figuras 15 a la 20, que no se demostró diferencias significativas.

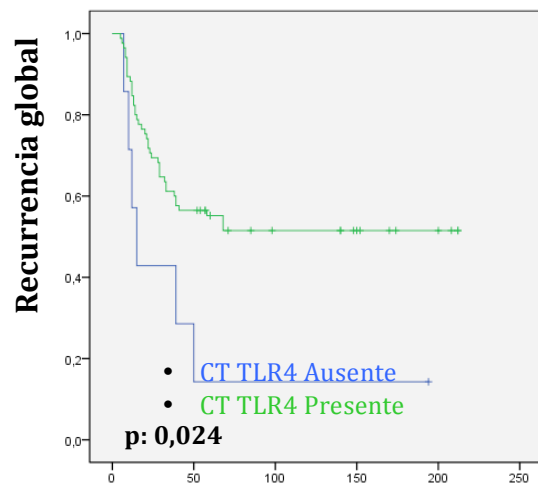
**Tabla 15:** Relación entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4, por los diferentes tipos celulares, y el número de eventos de recurrencia tumoral global.

Factor		CT		FIB		CMI	
		Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)
<b>MMP11</b>	Ausente	1	0 (0)	43	16 (37,2)	74	36 (48,6)
	Presente	92	44 (47,8)	50	28 (56)	19	8 (42,1)
<b>MMP13</b>	Ausente	16	6 (37,5)	85	40 (47)	66	30 (45,4)
	Presente	76	37 (48,6)	7	3 (42,8)	26	13 (50)
<b>TLR4</b>	Ausente	7	6 (85,7)	69	33 (47,8)	69	69 (52,1)
	Presente	85	39 (45,8)	23	12 (52,1)	23	9 (39,1)



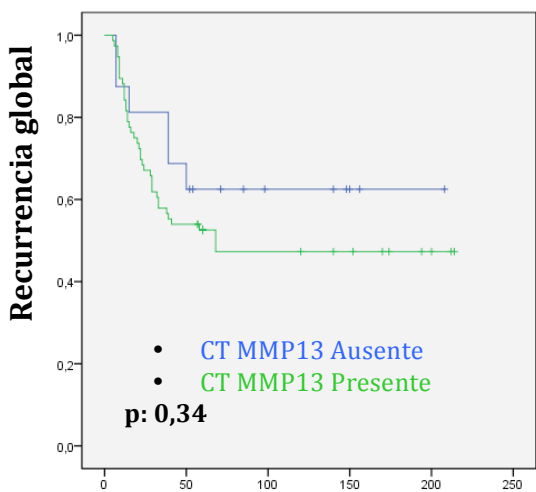
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 12:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de MMP11 por las células tumorales.



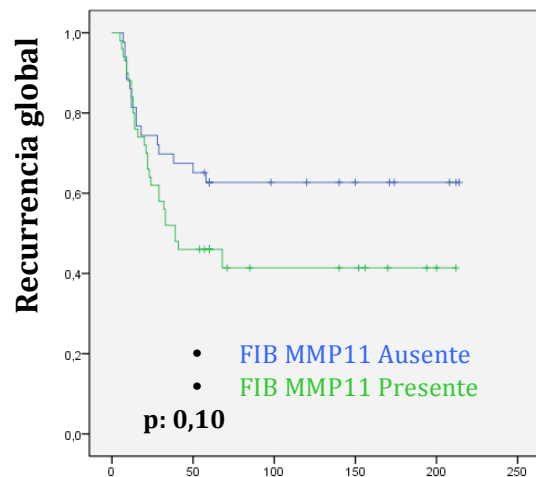
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 14:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de TLR4 por las células tumorales.



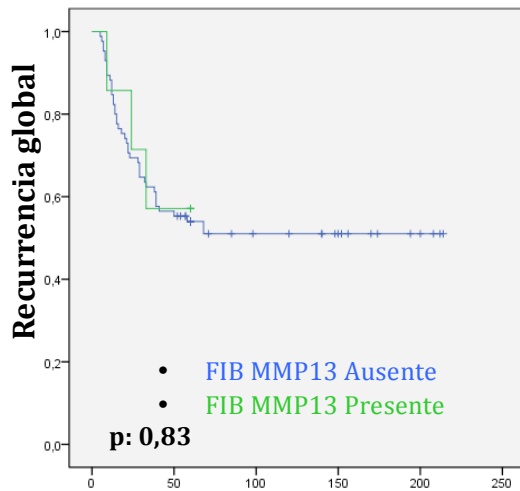
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 13:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de MMP13 por las células tumorales.



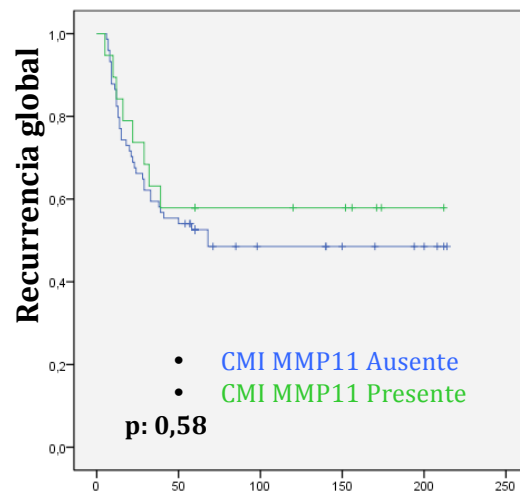
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 15:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de MMP11 por los Fibroblastos.



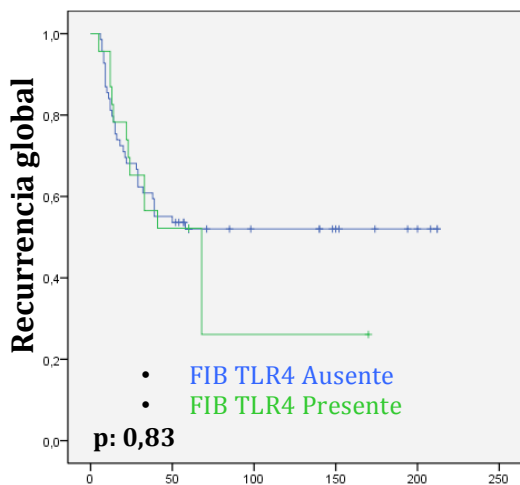
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 16:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de MMP13 por los Fibroblastos.



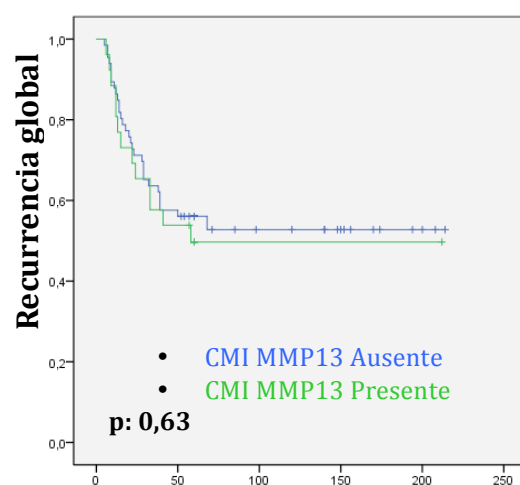
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 18:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de MMP11 por las Células Mononucleares Inflamatorias.



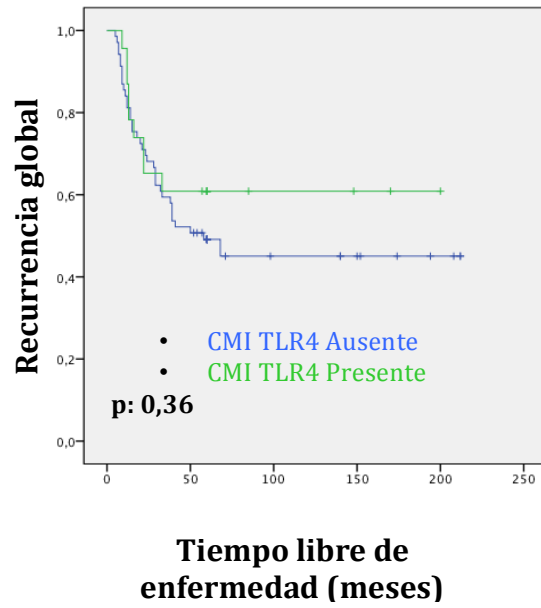
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 17:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de TLR4 por los Fibroblastos.



**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 19:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de MMP13 por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 20:** Probabilidad de recurrencia global según la expresión de TLR4 por las Células Mononucleares Inflamatorias.

## 6.- Relación de la expresión de los factores con la recurrencia tumoral local.

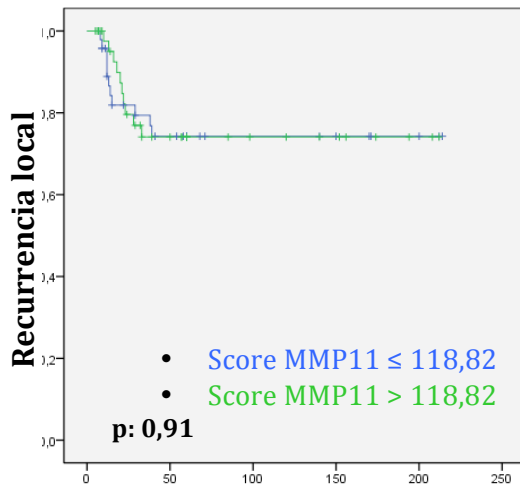
Se estudió la relación entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4 y la recurrencia tumoral local, tanto para los factores globales, como para los diferentes tipos celulares. Considerándose como recurrencia local, a la reaparición del tumor en el mismo sitio o región de origen.

### a) Expresión Global:

En la Tabla 16 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según la mediana del *score*. Las figuras 21, 22 y 23 se muestran las curvas de recurrencia local según los factores globales (*score*), donde no se ha encontrado relaciones significativas.

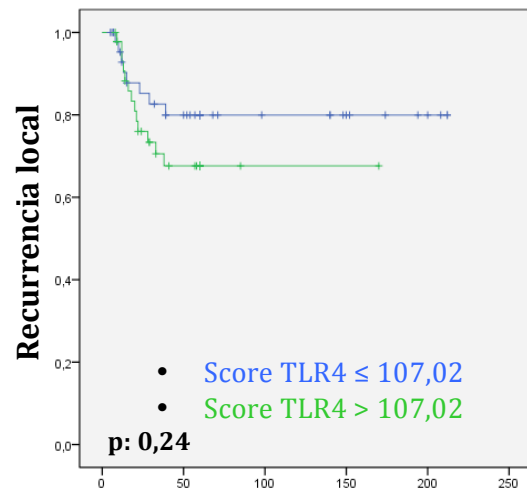
**Tabla 16:** Relación entre la expresión global (*score*) de MMP11, MMP13, TLR4, y el número de eventos de recurrencia tumoral local.

<b>Factor</b>	<b>Mediana Score</b>	<b>N° Total</b>	<b>N° Eventos (%)</b>
<b>MMP11</b>	≤ 118,82	47	11 (23,4)
	> 118,82	46	10 (21,7)
<b>MMP13</b>	≤ 75,17	46	8 (17,3)
	> 75,17	46	12 (26)
<b>TLR4</b>	≤ 107,02	46	8 (17,3)
	> 107,02	46	13 (28,2)



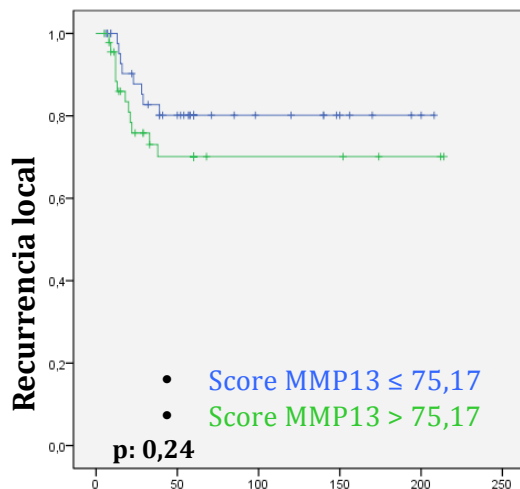
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 21:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de la mediana del *score* de MMP11.



**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 23:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de la mediana del *score* de TLR4.



**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 22:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de la mediana del *score* de MMP13.

### b) Expresión por tipo celular:

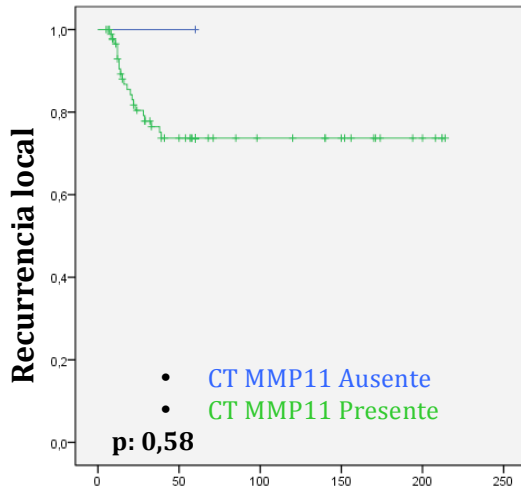
En la Tabla 17 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según los diferentes tipos celulares estudiados.

Las figuras 24 a la 32 se demuestran la relación de los factores según el tipo celular: célula tumoral, fibroblasto y célula mononuclear inflamatoria; sin evidencia de relaciones significativas con respecto a la recurrencia local.

**Tabla 17:** Relación entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4, por los diferentes tipos celulares, y el número de eventos de recurrencia tumoral local.

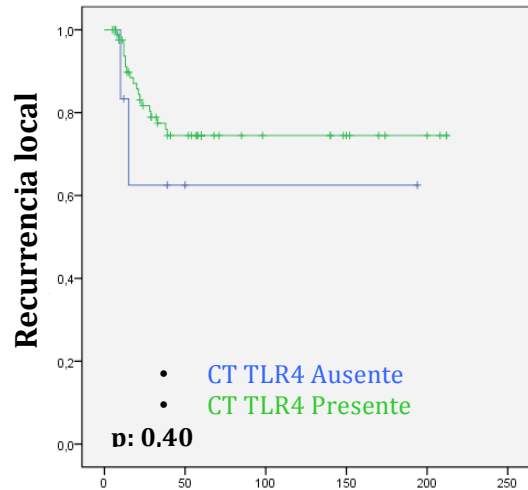
Factor		CT		FIB		CMI	
		Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)
<b>MMP11</b>	Ausente	1	0 (0)	43	8 (18,6)	74	17 (22,9)
	Presente	92	21 (23)	50	13 (26)	19	4 (21)
<b>MMP13</b>	Ausente	16	1 (6,2)	85	19 (22,3)	66	14 (21,2)
	Presente	76	19 (25)	7	1 (14,2)	26	6 (23)
<b>TLR4</b>	Ausente	7	2 (28,5)	69	16 (23,1)	69	15 (21,7)
	Presente	85	19 (22,3)	23	5 (21,7)	23	6 (26)





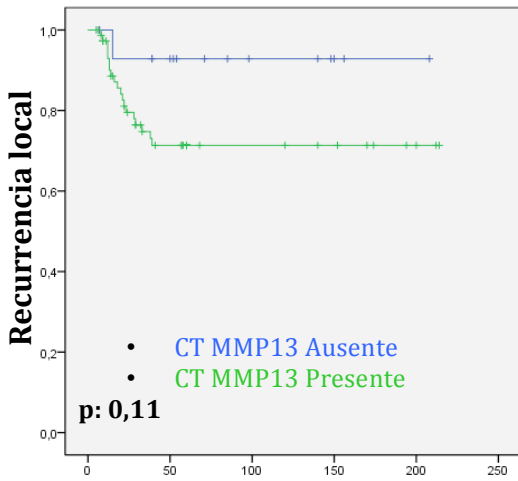
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 24:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de MMP11 por las células tumorales.



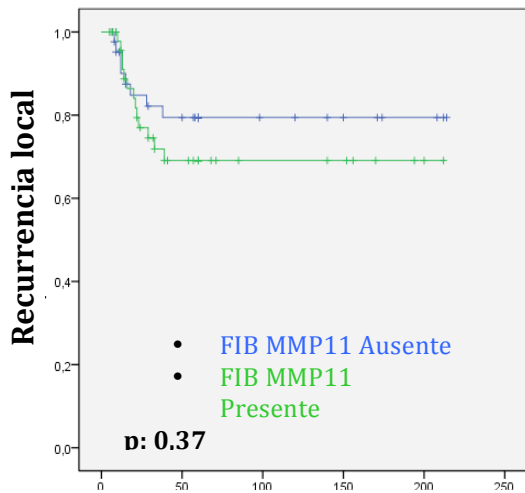
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 26:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de TLR4 por las células tumorales.



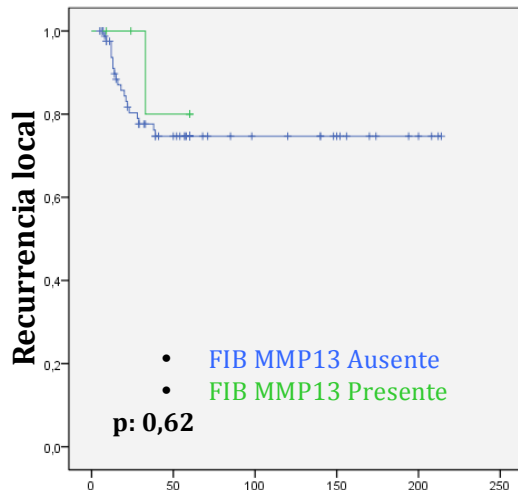
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 25:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de MMP13 por las células tumorales.



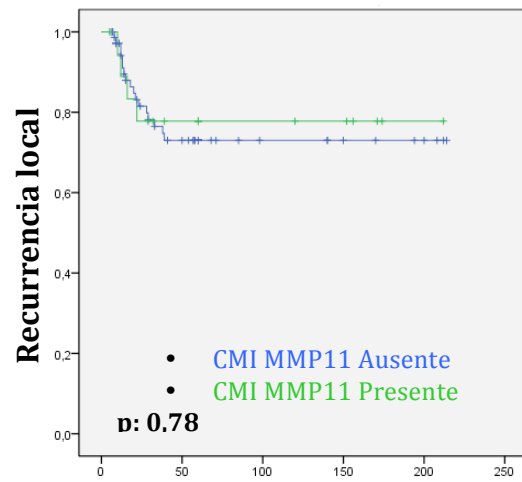
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 27:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de MMP11 por los Fibroblastos.



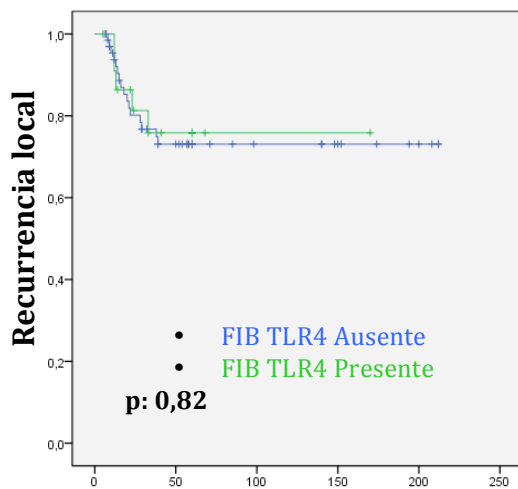
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 28:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de MMP13 por los Fibroblastos.



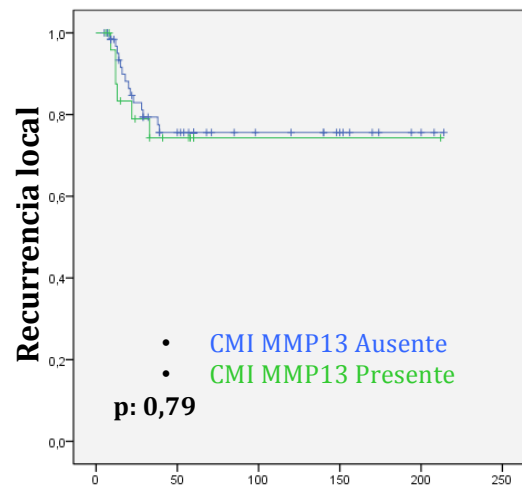
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 30:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de MMP11 por las Células Mononucleares Inflamatorias.



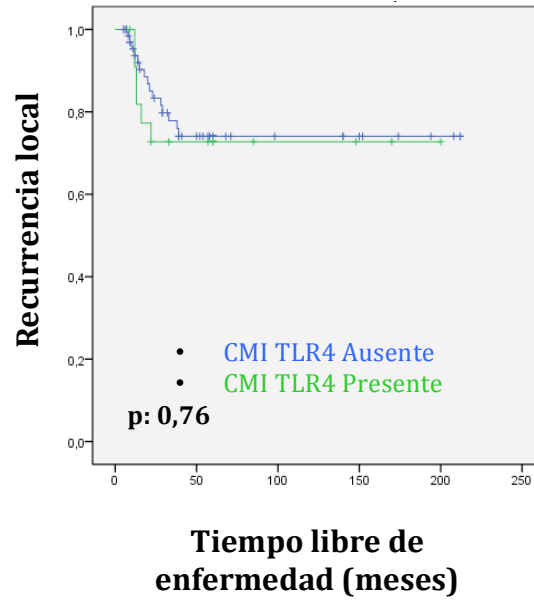
**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 29:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de TLR4 por los Fibroblastos.



**Tiempo libre de enfermedad (meses)**

**Figura 31:** Probabilidad de recurrencia local según la expresión de MMP13 por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 32:** : Probabilidad de recurrencia local según la expresión de TLR4 por las Células Mononucleares Inflamatorias.

## 7.- Relación de la expresión de los factores, con la recurrencia por carcinomatosis.

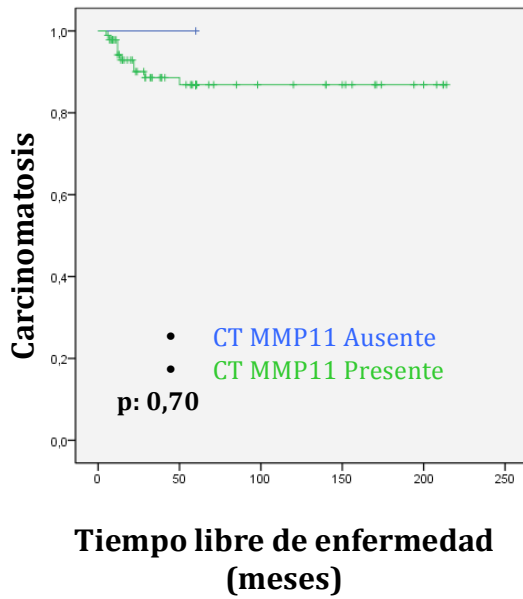
Se comparó la expresión de los factores por tipo celular y la recurrencia tumoral por carcinomatosis, considerándose como carcinomatosis a la aparición del tumor en el peritoneo abdominal. En la Tabla 18 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores.

Se evidencia una relación estadísticamente significativa de forma negativa, para la expresión de célula tumoral de TLR4 y la aparición de carcinomatosis. Figura 35.

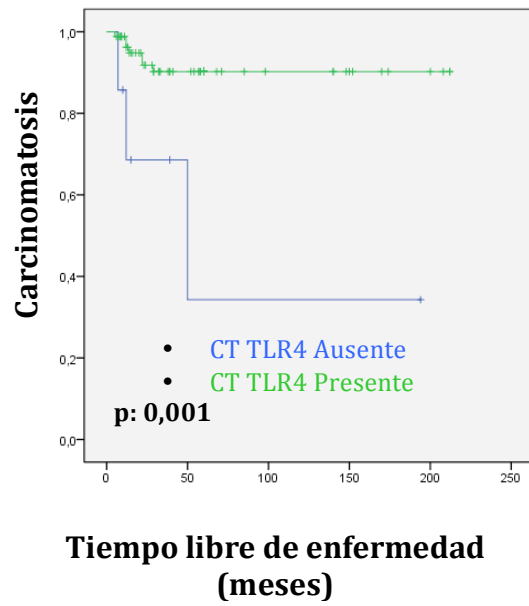
El resto de factores no se demostró relación significativa. Figura 33, 34, 36 – 41.

**Tabla 18:** Relación entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4, por los diferentes tipos celulares, y el número de aparición de carcinomatosis.

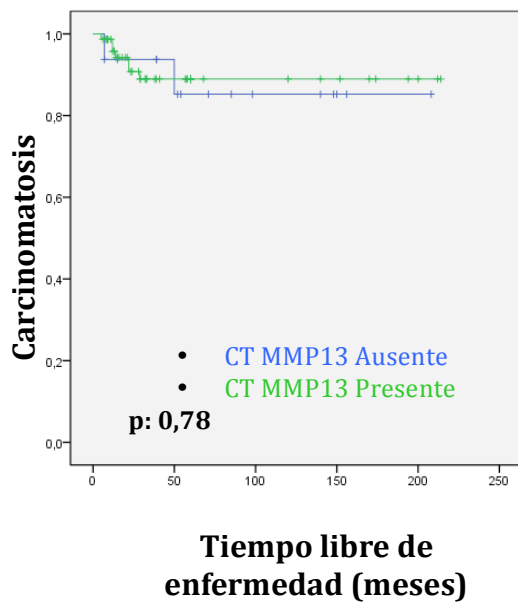
Factor		CT		FIB		CMI	
		Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)
<b>MMP11</b>	Ausente	1	0 (0)	43	2 (4,6)	74	7 (9,4)
	Presente	92	10 (10,8)	50	8 (16)	19	3 (15,7)
<b>MMP13</b>	Ausente	16	2 (12,5)	85	9 (10,5)	66	7 (10,6)
	Presente	76	7 (9,2)	7	0 (0)	26	2 (7,6)
<b>TLR4</b>	Ausente	7	3 (42,8)	69	6 (8,6)	69	7 (10,1)
	Presente	85	7 (8,2)	23	4 (17,3)	23	3 (13)



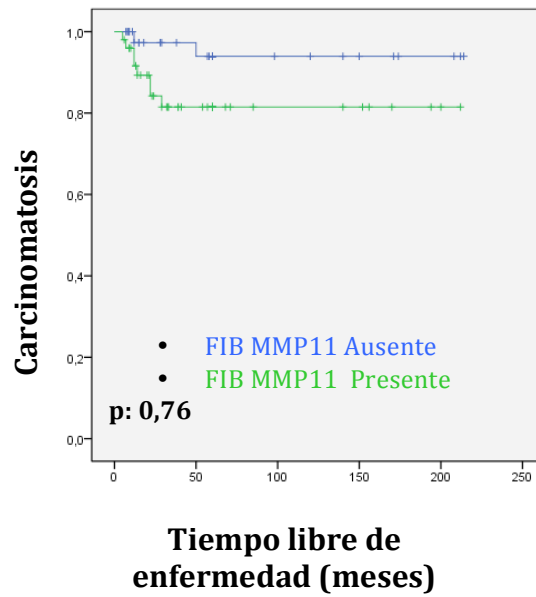
**Figura 33:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de MMP11, por las Células Tumorales.



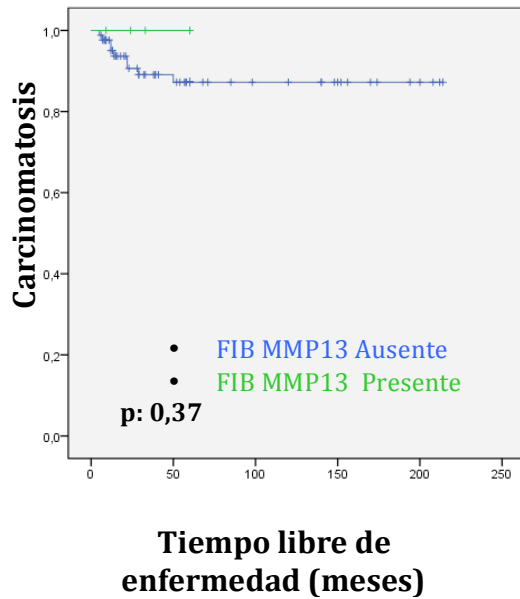
**Figura 35:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de TLR4, por las Células Tumorales.



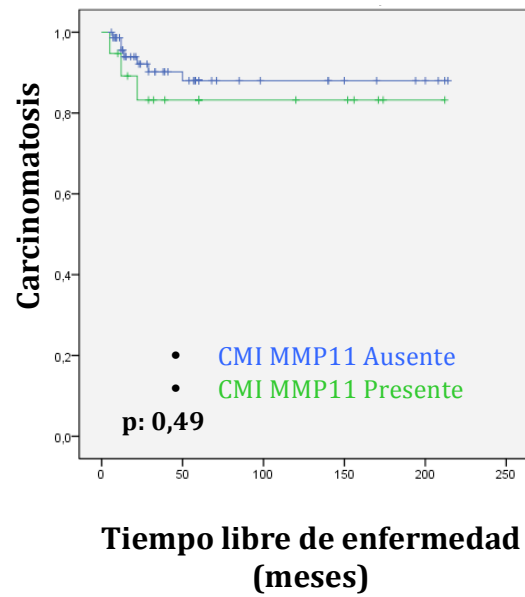
**Figura 34:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de MMP13, por las Células Tumorales.



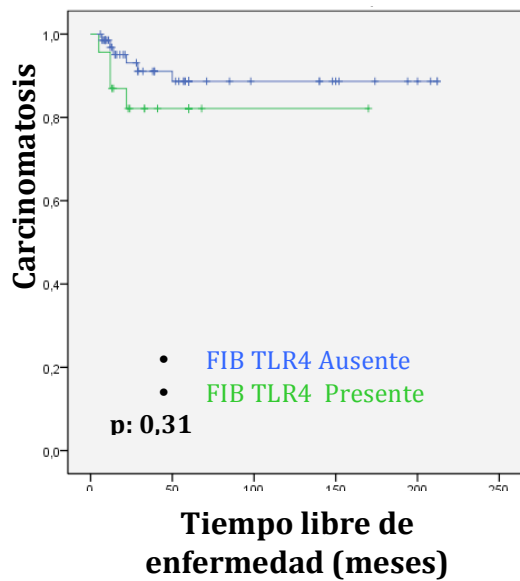
**Figura 36:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de MMP11, por los Fibroblastos.



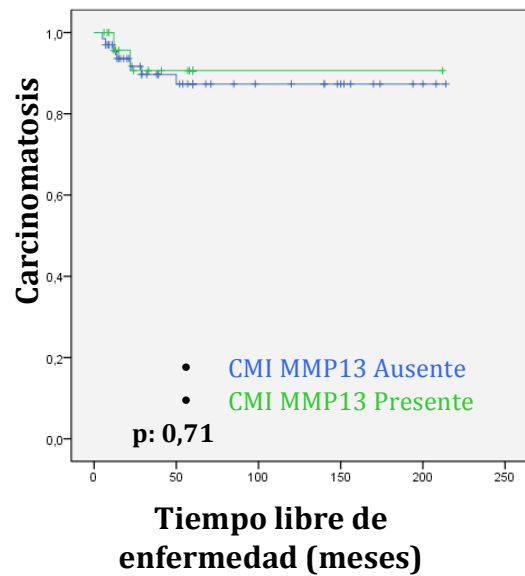
**Figura 37:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de MMP13, por los Fibroblastos.



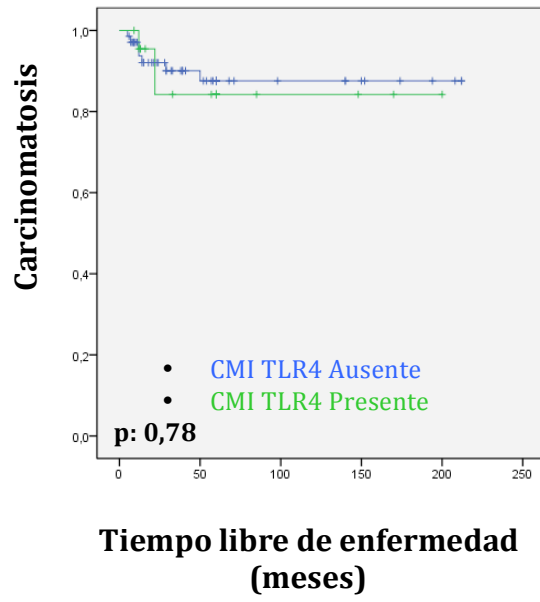
**Figura 39:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de MMP11, por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 38:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de TLR4, por los Fibroblastos.



**Figura 40:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de MMP13, por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 41:** Probabilidad de carcinomatosis según la expresión de TLR4, por las Células Mononucleares Inflamatorias.

## 8-. Relación de la expresión de los factores, con la recurrencia a distancia.

Se realizó análisis de la relación entre la recurrencia tumoral a distancia y los factores de la expresión global (*scores*), así como por tipo celular, de MMP11, MMP13 y TLR4; además un análisis por asociaciones en grupos combinando MMP11 y TLR4. Considerándose como recurrencia a distancia, la reaparición del tumor en un sitio distinto al de origen.

### a) Expresión global:

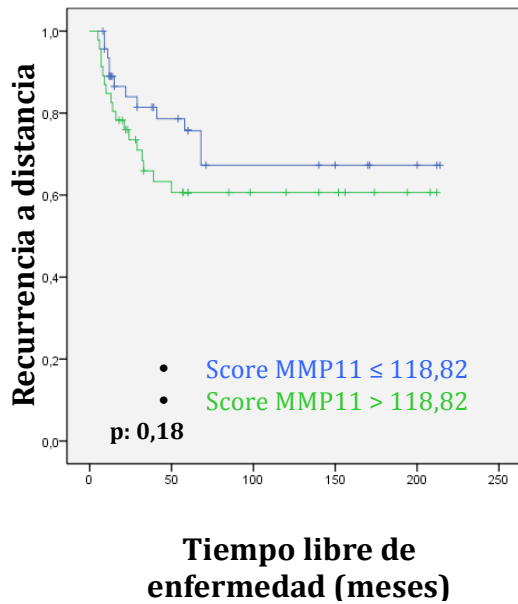
En la Tabla 19 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según la mediana del *score*.

En el estudio no se encontró relación significativa entre la expresión global (*score*) y la recurrencia tumoral a distancia. Figuras 42, 43 y 44.

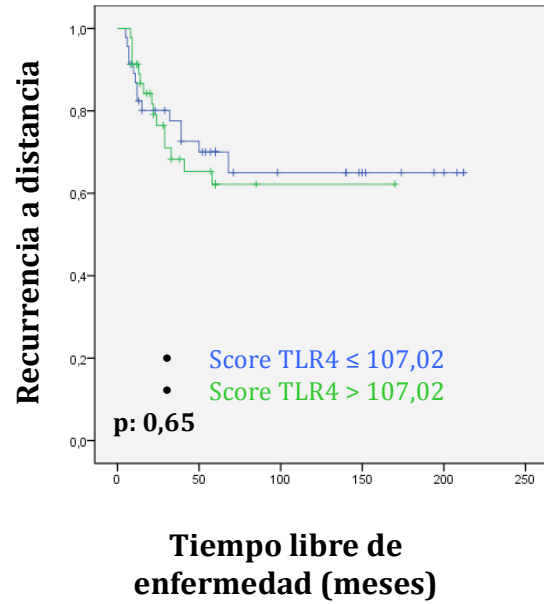
**Tabla 19:** Relación entre la expresión global (*score*) de MMP11, MMP13, TLR4, y el número de eventos de recurrencia tumoral a distancia.

Factor	Mediana Score	N° Total	N° Eventos (%)
MMP11	≤ 118,82	47	11 (23,4)
	> 118,82	46	17 (36,9)
MMP13	≤ 75,17	46	14 (30,4)
	> 75,17	46	13 (28,2)
TLR4	≤ 107,02	46	14 (30,4)
	> 107,02	46	15 (32,6)

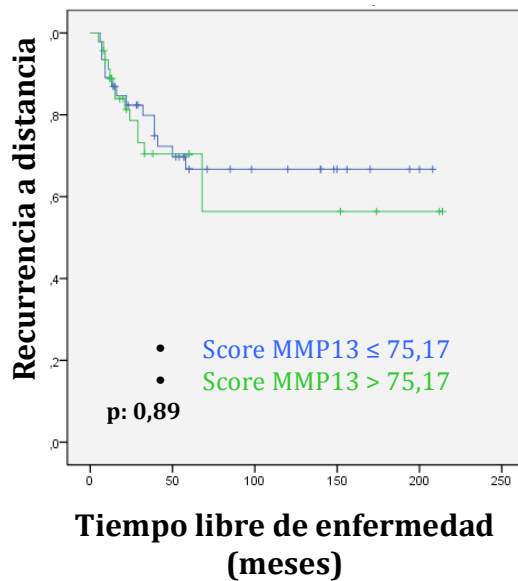




**Figura 42:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de la mediana del *score* de MMP11.



**Figura 44:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de la mediana del *score* de TLR4.



**Figura 43:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de la mediana del *score* de MMP13.

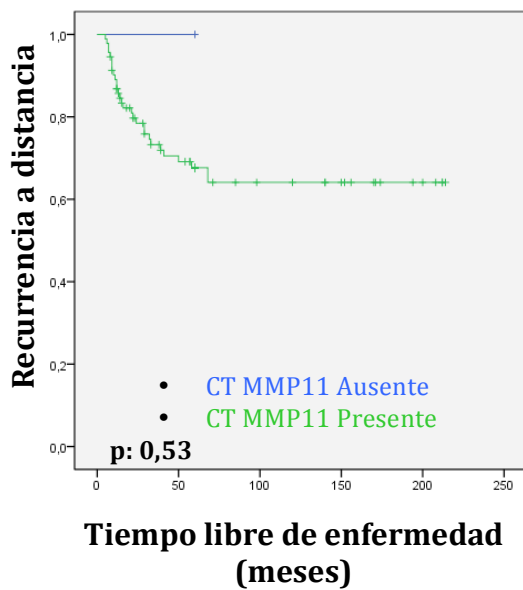
**b) Expresión por tipo celular:**

En la Tabla 20 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según los diferentes tipos celulares estudiados.

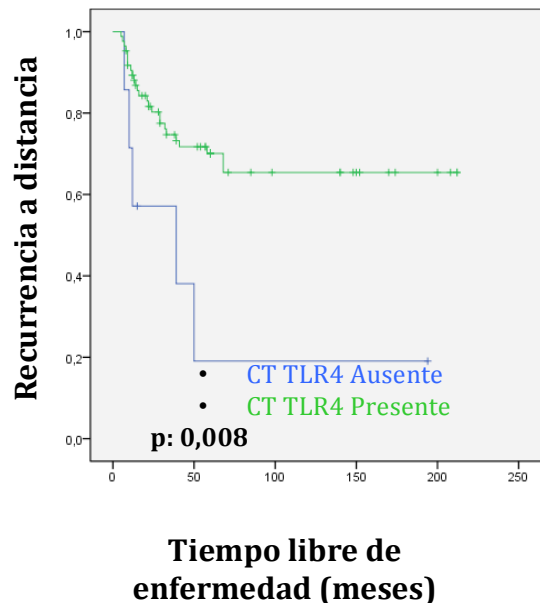
Al analizar la relación entre la recurrencia a distancia y la expresión de los factores por tipo celular; se demostró que existe una relación significativamente negativa entre la expresión de TLR4 por la células tumorales (figura 47), así como una relación significativamente positiva, por los fibroblastos de MMP11 (figura 48); mientras que resto de los tipos celulares no demostraron significancia. Figuras 45, 46, 49 – 53.

**Tabla 20:** Relación de la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4, por los diferentes tipos celulares, y el número de eventos de aparición de recurrencia tumoral a distancia.

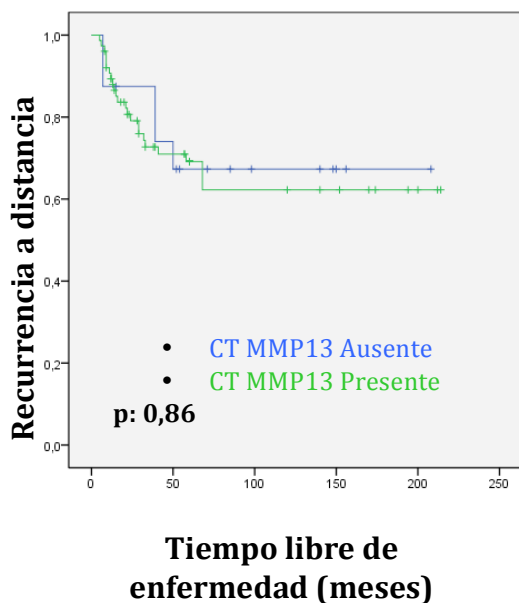
Factor		CT		FIB		CMI	
		Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)
<b>MMP11</b>	Ausente	1	0 (0)	43	8 (18,6)	74	21 (28,3)
	Presente	92	28 (30,4)	50	20 (40)	19	7 (36,8)
<b>MMP13</b>	Ausente	16	5 (31,2)	85	25 (29,4)	66	18 (27,2)
	Presente	76	22 (28,9)	7	2 (28,5)	26	9 (34,6)
<b>TLR4</b>	Ausente	7	5 (71,4)	69	20 (28,9)	69	23 (33,3)
	Presente	85	24 (28,2)	23	9 (31,9)	23	6 (26)



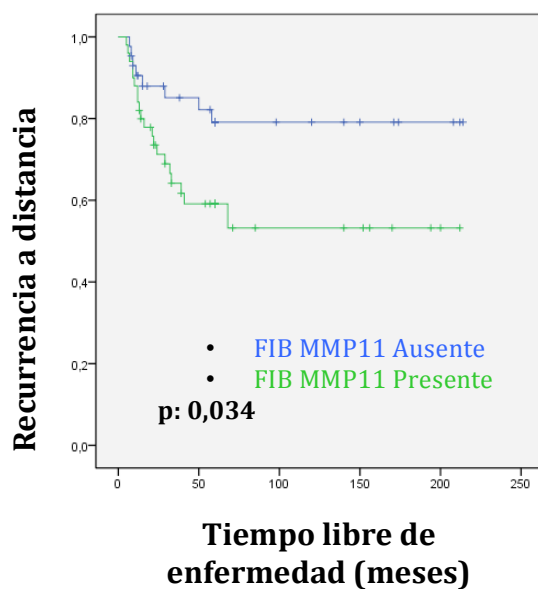
**Figura 45:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de MMP11, por las Células Tumorales.



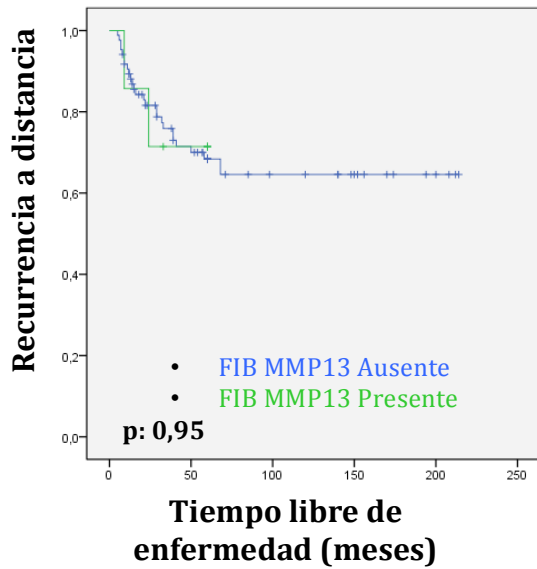
**Figura 47:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de TLR4, por las Células Tumorales.



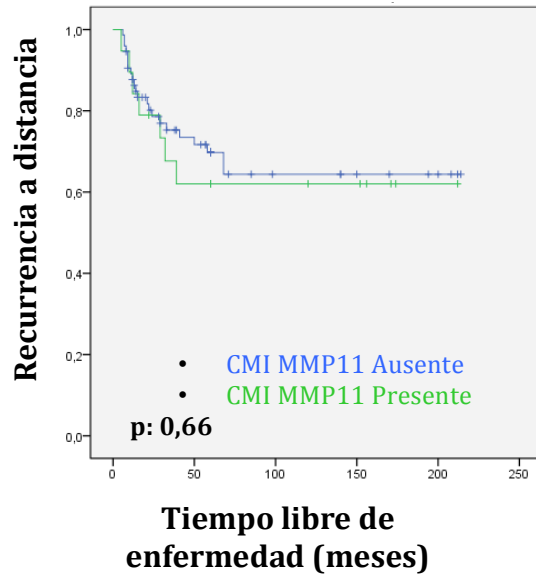
**Figura 46:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de MMP13, por las Células Tumorales.



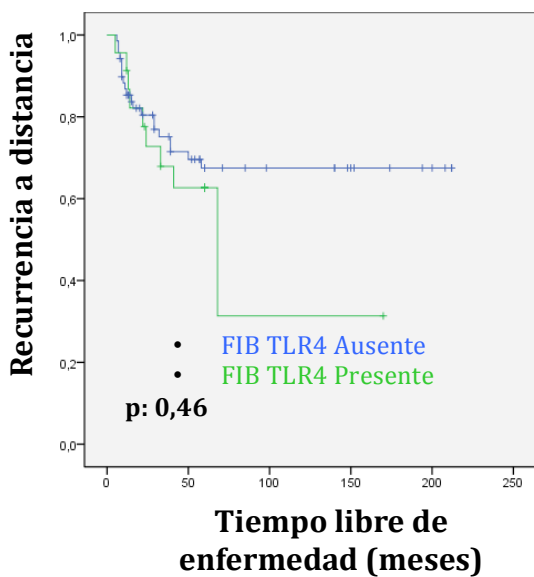
**Figura 48:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de MMP11, por los Fibroblastos.



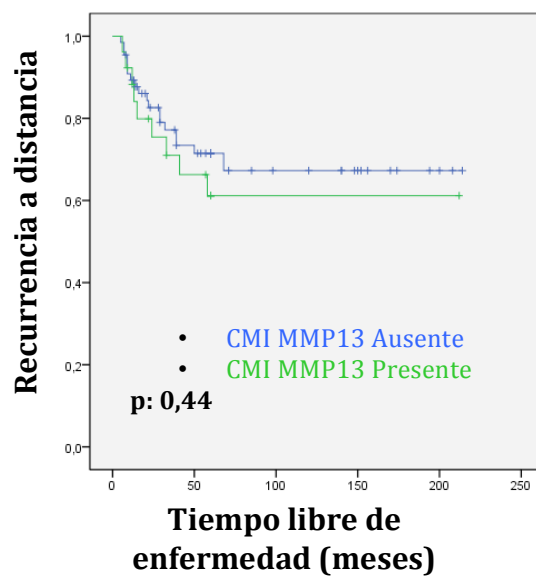
**Figura 49:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de MMP13, por los Fibroblastos.



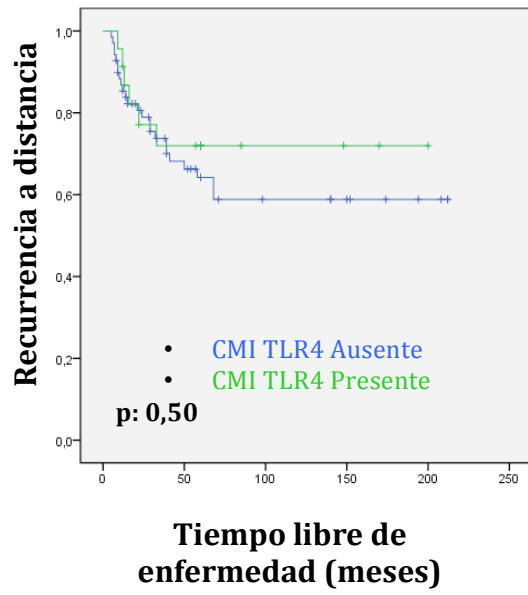
**Figura 51:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de MMP11, por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 50:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de TLR4, por los Fibroblastos.



**Figura 52:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de MMP13, por las Células Mononucleares Inflamatorias.



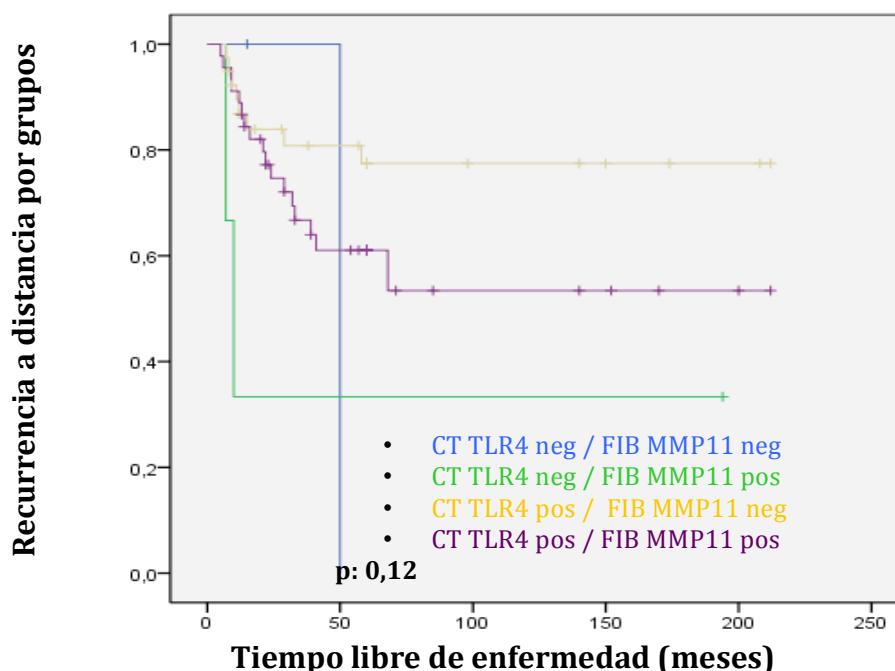
**Figura 53:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión de TLR4, por las Células Mononucleares Inflamatorias.

**c) Expresión por grupos:**

Además se realizó el análisis por grupos combinando las expresiones de fibroblastos de MMP11 y célula tumoral de TLR4; en la Tabla 21 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según los diferentes tipos celulares estudiados. No se encontró ninguna relación significativa (Figura 54).

**Tabla 21:** Relación entre la expresión de TLR4 por células tumorales y MMP11 por los FIB, asociada por grupos, y el número de eventos de aparición de recurrencia tumoral a distancia.

GRUPOS	Nº TOTAL	Nº EVENTOS (%)
CT TLR4 negativo/FIB MMP11 negativo	2	1 (50)
CT TLR4 negativo/FIB MMP11 positivo	3	2 (66,6)
CT TLR4 positivo/FIB MMP11 negativo	39	8 (20,5)
CT TLR4 positivo/FIB MMP11 positivo	45	17 (37,7)



**Figura 54:** Probabilidad de recurrencia a distancia según la expresión por grupos de MMP11 por los Fibroblastos y TLR4 por las células tumorales.

## 9.- Relación de la expresión de los factores, según la recurrencia por metástasis hepáticas.

Se realizó el análisis de la relación que existe en la expresión de los factores globales de expresión (*score*) y por el tipo celular, con la aparición de metástasis hepáticas.

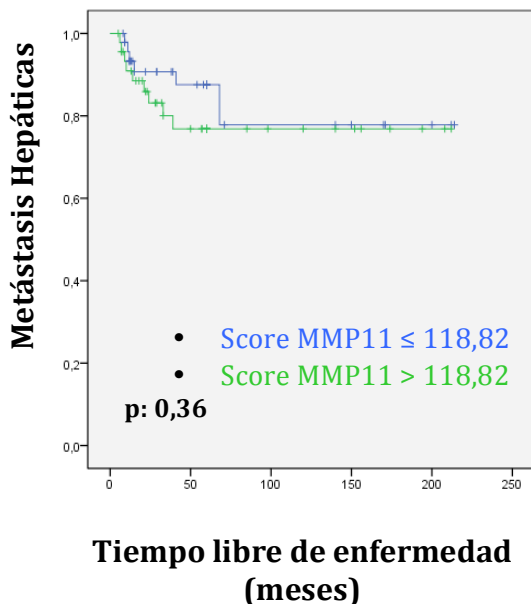
### a) Expresión global:

En la Tabla 22 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según la mediana del *score*.

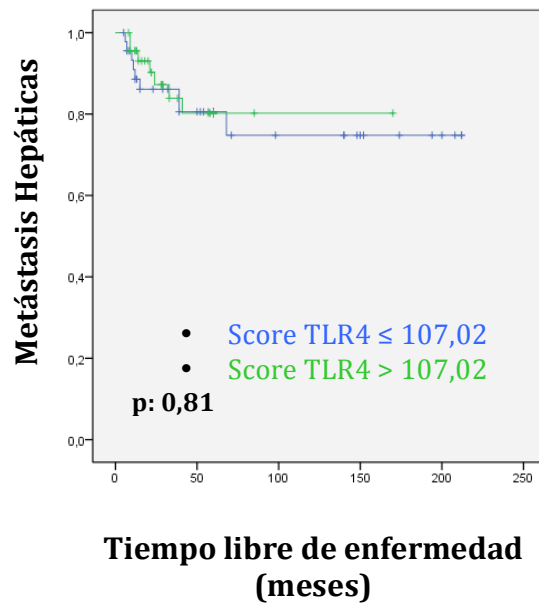
Al analizar la relación entre los factores globales de la expresión (*scores*) de MMP11, MMP13 y TLR4, y las metástasis hepáticas (figuras 55, 56, y 57), no se encontró ninguna relación significativa.

**Tabla 22:** Relación entre la expresión global (*score*) de MMP11, MMP13, TLR4, y el número de eventos de aparición de metástasis hepáticas.

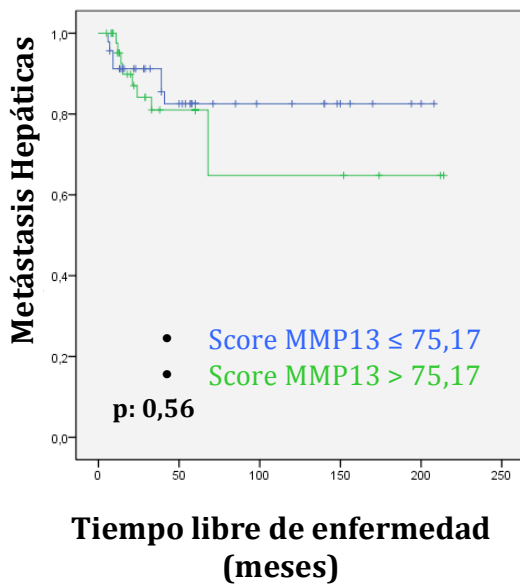
Factor	Mediana Score	N° Total	N° Eventos (%)
<b>MMP11</b>	≤ 118,82	47	6 (12,7)
	> 118,82	46	9 (19,5)
<b>MMP13</b>	≤ 75,17	46	7 (15,2)
	> 75,17	46	8 (17,3)
<b>TLR4</b>	≤ 107,02	46	9 (19,5)
	> 107,02	46	7 (15,2)



**Figura 55:** Probabilidad de metástasis hepáticas según la expresión de la mediana del *score* de MMP11.



**Figura 57:** Probabilidad de metástasis hepáticas según la expresión de la mediana del *score* de TLR4.



**Figura 56:** Probabilidad de metástasis hepáticas según la expresión de la mediana del *score* de MMP13.



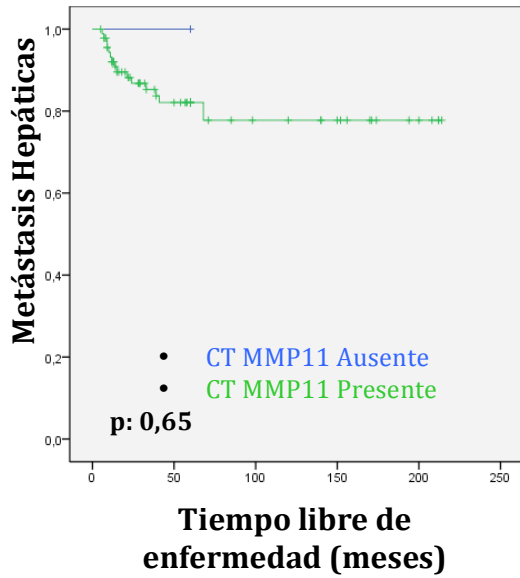
**b) Expresión por tipo celular:**

En la Tabla 23 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según los diferentes tipos celulares estudiados.

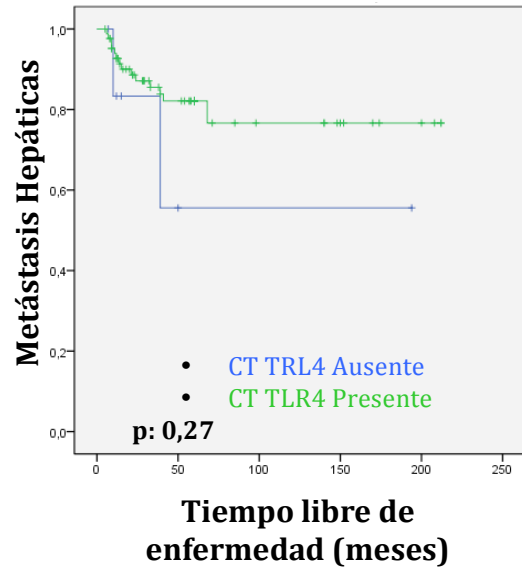
Al realizar el estudio de la relación entre expresión según del tipo celular y la aparición de metástasis hepáticas; se demostró una relación significativa positiva, por los fibroblastos de MMP11, (figura 61). El resto de tipos celulares no se ha demostrado relación significativa, figuras 58 – 60, 62 – 66.

**Tabla 23:** Relación entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4, por los diferentes tipos celulares, y el número de eventos de aparición de metástasis hepáticas.

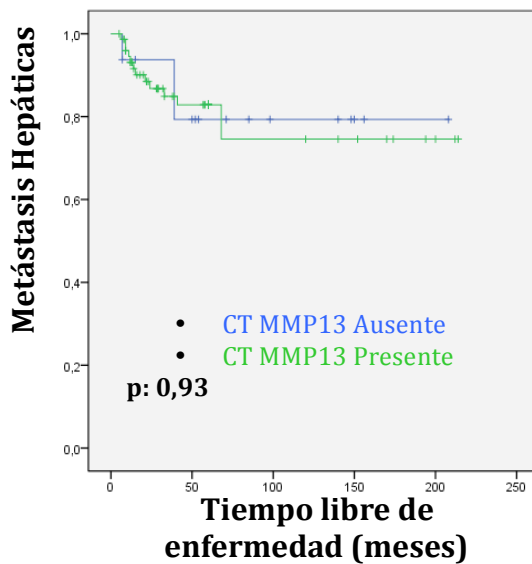
Factor		CT		FIB		CMI	
		Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)
<b>MMP11</b>	Ausente	1	0 (0)	43	3 (6,9)	74	12 (16,2)
	Presente	92	15 (16,3)	50	12 (24)	19	3 (15,7)
<b>MMP13</b>	Ausente	16	3 (18,7)	85	13 (15,2)	66	9 (13,6)
	Presente	76	12 (15,7)	7	2 (28,5)	26	6 (23)
<b>TLR4</b>	Ausente	7	2 (28,5)	69	10 (14,4)	69	13 (18,8)
	Presente	85	14 (16,4)	23	6 (26)	23	3 (13)



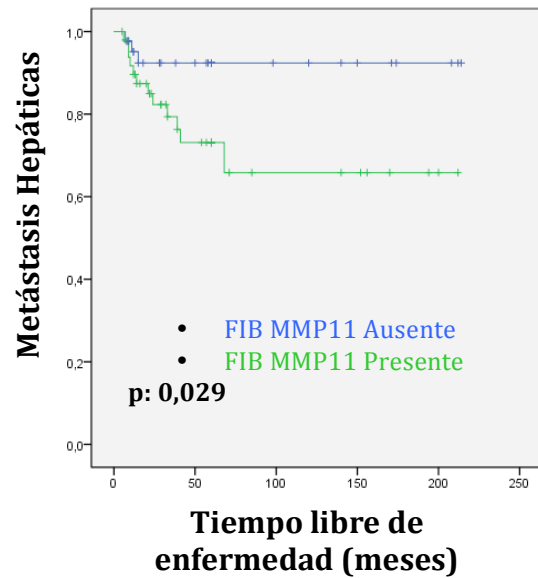
**Figura 58:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de MMP11, por las Células Tumorales.



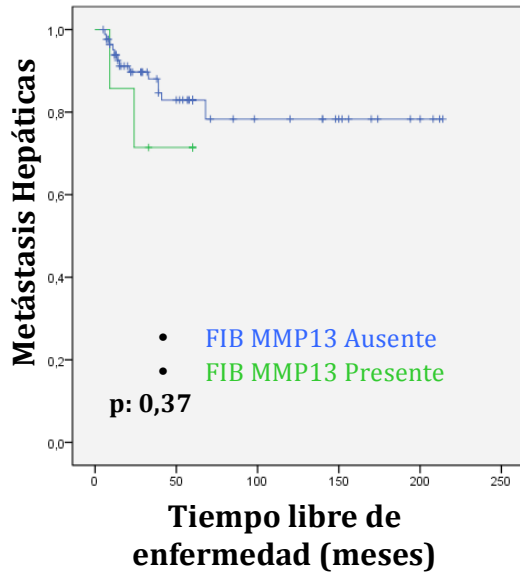
**Figura 60:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de TLR4, por las Células Tumorales.



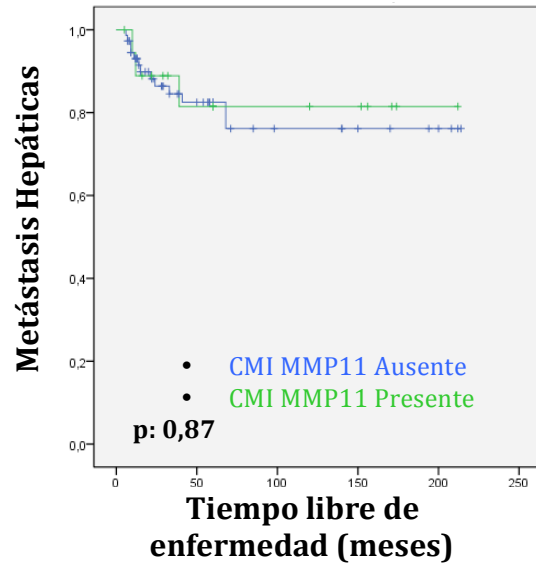
**Figura 59:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de MMP13, por las Células Tumorales.



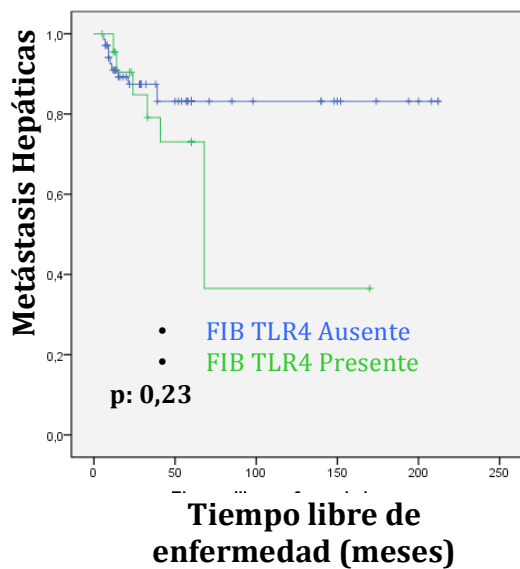
**Figura 61:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de MMP11, por los Fibroblastos.



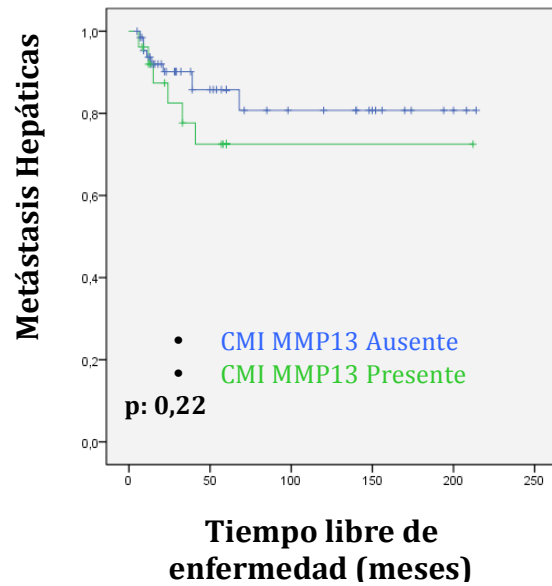
**Figura 62:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de MMP13, por los Fibroblastos.



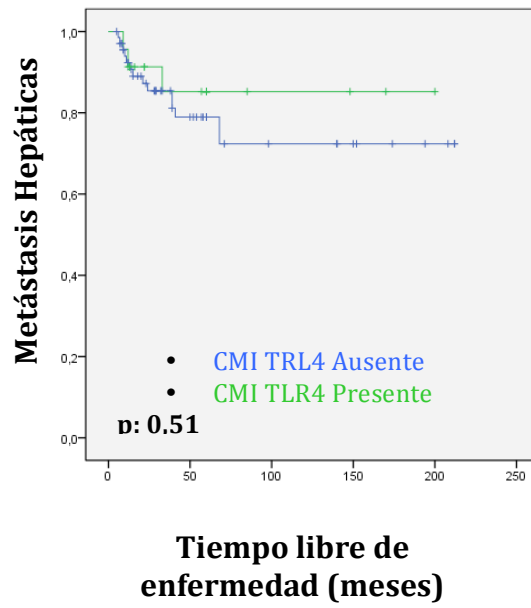
**Figura 64:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de MMP11, por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 63:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de TLR4, por los Fibroblastos.



**Figura 65:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de MMP13, por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 66:** Probabilidad de Metástasis Hepáticas según la expresión de TLR4, por las Células Mononucleares Inflamatorias.

## 10.- Relación de la expresión de los factores, con la recurrencia por metástasis pulmonares.

Se estudió la relación entre la expresión los factores globales (*score*) y por tipo celular, con la aparición de metástasis pulmonares.

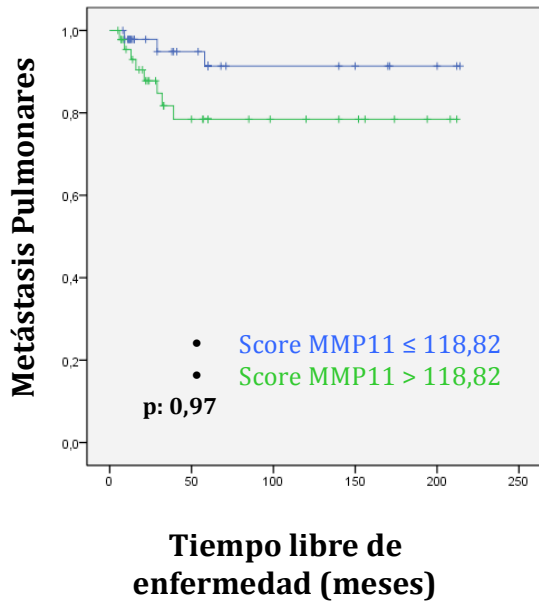
### a) Expresión global:

Se analizó la expresión global (*scores*) de MMP11, MMP13 y TLR4; y la aparición de metástasis pulmonares; en la Tabla 24 se resume el número de casos en los que se observó la expresión según la mediana del *score*.

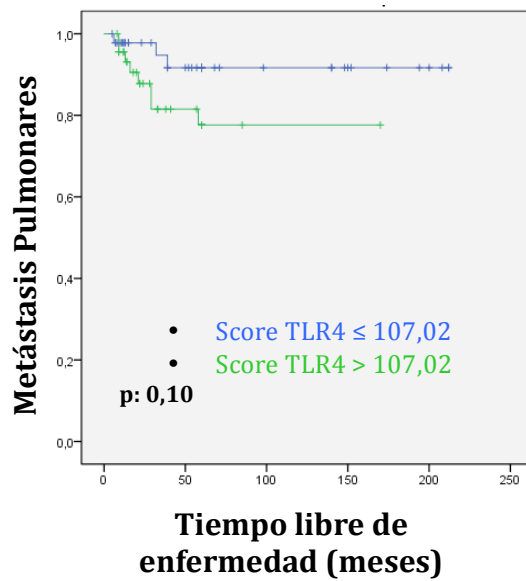
Al analizar la expresión global, figuras 67, 68, y 69; no se ha encontrado relaciones significativas con la aparición de metástasis pulmonares.

**Tabla 24:** Relación entre la expresión global (*score*)de MMP11, MMP13, TLR4, y el número de eventos de la aparición de metástasis pulmonares.

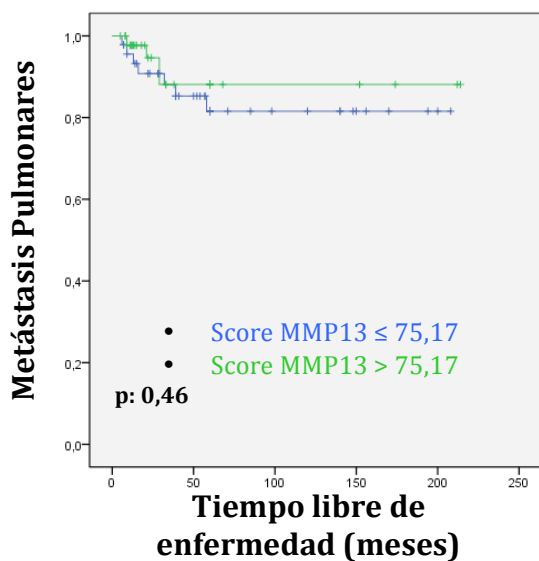
<b>Factor</b>	<b>Mediana Score</b>	<b>N° Total</b>	<b>N° Eventos (%)</b>
<b>MMP11</b>	≤ 118,82	47	3 (6,3)
	> 118,82	46	8 (17,3)
<b>MMP13</b>	≤ 75,17	46	7 (15,2)
	> 75,17	46	4 (8,6)
<b>TLR4</b>	≤ 107,02	46	3 (6,5)
	> 107,02	46	8 (17,3)



**Figura 67:** Probabilidad de metástasis pulmonares según la expresión de la mediana del *score* de MMP11.



**Figura 69:** Probabilidad de metástasis pulmonares según la expresión de la mediana del *score* de TLR4.



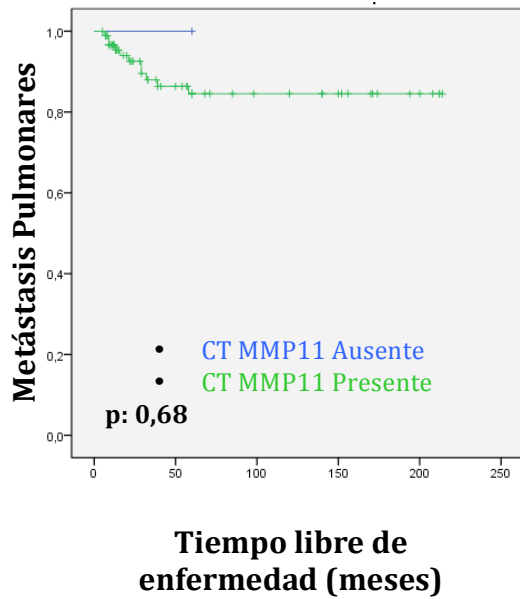
**Figura 68:** Probabilidad de metástasis pulmonares según la expresión de la mediana del *score* de MMP13.

**b) Expresión por tipo celulares:**

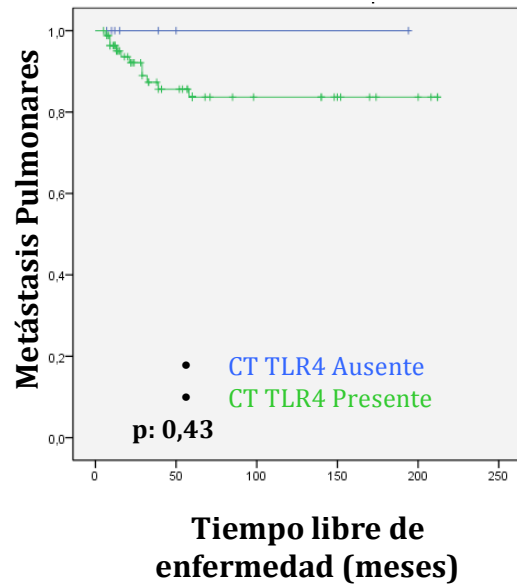
En cuanto al análisis por tipo celular y metástasis pulmonares; en la Tabla 25 se resume el número de casos en los que se observó la expresión por los diferentes tipos celulares. No se demostró relación significativa, figuras 70 a la 78.

**Tabla 25:** Relación entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4, por los diferentes tipos celulares, y número de eventos de la aparición de metástasis pulmonares.

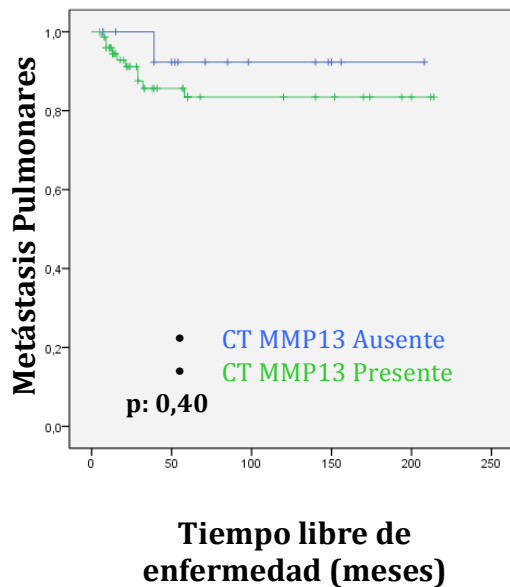
Factor		CT		FIB		CMI	
		Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)
<b>MMP11</b>	Ausente	1	0 (0)	43	3 (6,9)	74	7 (9,4)
	Presente	92	11 (11,9)	50	8 (16)	19	4 (21)
<b>MMP13</b>	Ausente	16	1 (6,2)	85	10 (11,7)	66	8 (12,1)
	Presente	76	10 (13,1)	7	1 (14,2)	26	3 (11,5)
<b>TLR4</b>	Ausente	7	0 (0)	69	10 (14,4)	69	8 (11,5)
	Presente	85	11 (12,9)	23	1 (4,3)	23	3 (13)



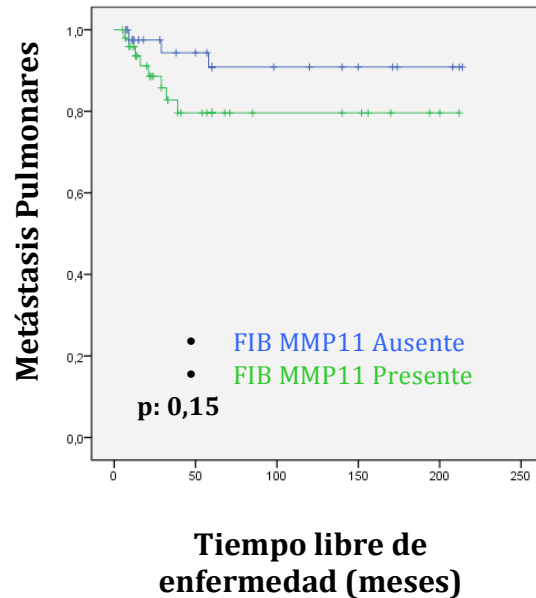
**Figura 70:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de MMP11, por las Células Tumorales.



**Figura 72:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de TLR4, por las Células Tumorales.

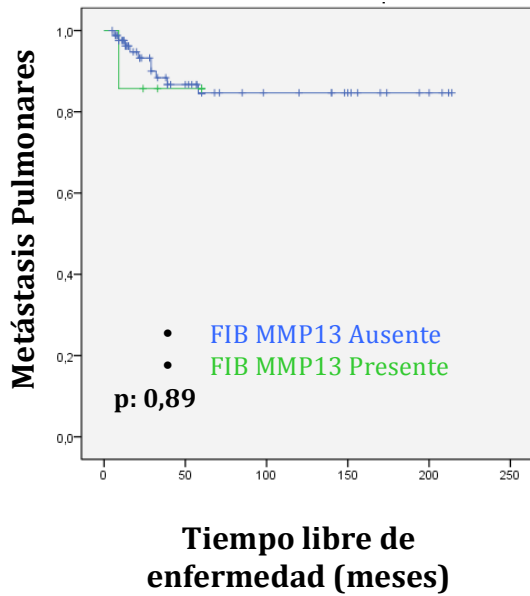


**Figura 71:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de MMP13, por las Células Tumorales.

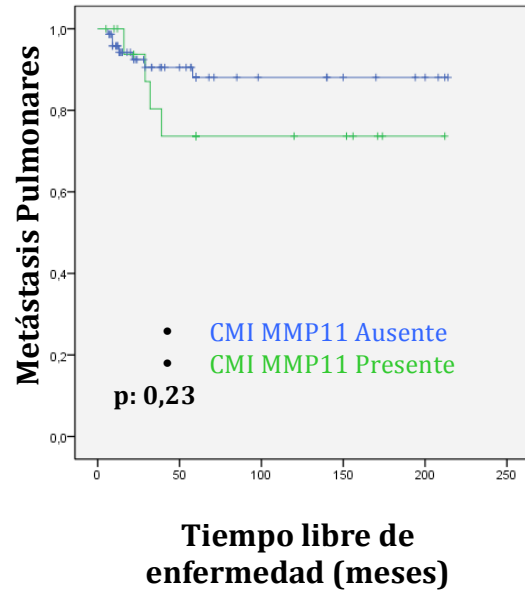


**Figura 73:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de MMP11, por los Fibroblastos.

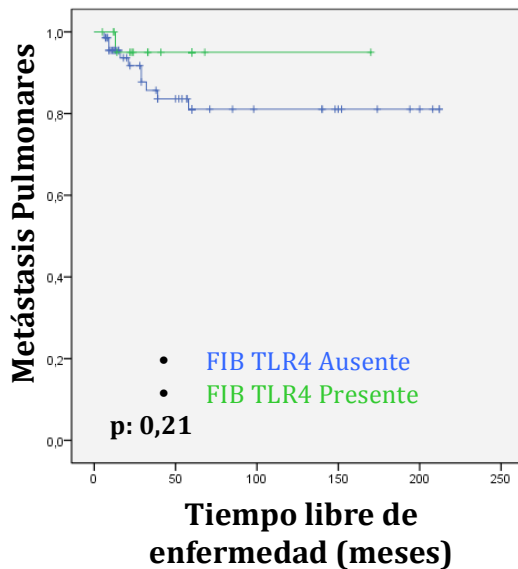




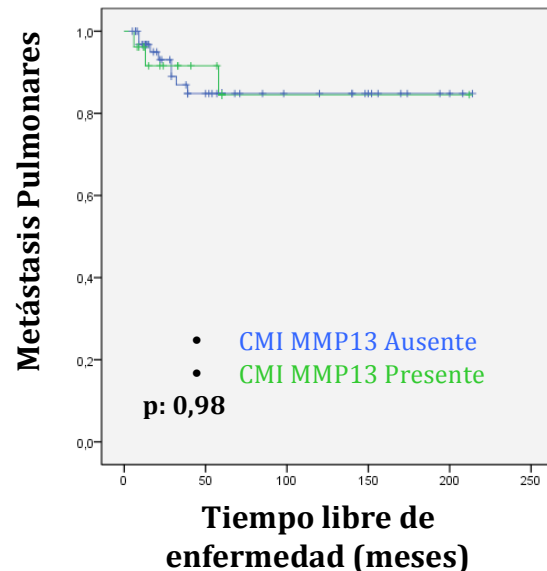
**Figura 74:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de MMP13, por los Fibroblastos.



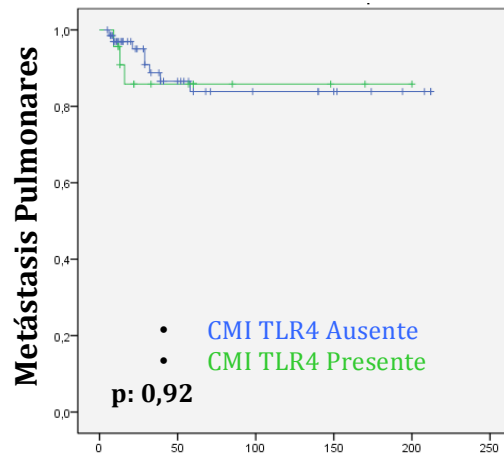
**Figura 76:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de MMP11, por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 75:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de TLR4, por los Fibroblastos.



**Figura 77:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de MMP13, por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 78:** Probabilidad de Metástasis Pulmonares según la expresión de TLR4, por las Células Mononucleares Inflamatorias.

## 11.- Relación de la expresión de los diferentes factores con la supervivencia.

Como otro de los objetivos del estudio, se realizó el análisis de la relación que existe entre la expresión de los factores globales (*score*), por tipos celulares y por grupos; con la supervivencia de los pacientes.

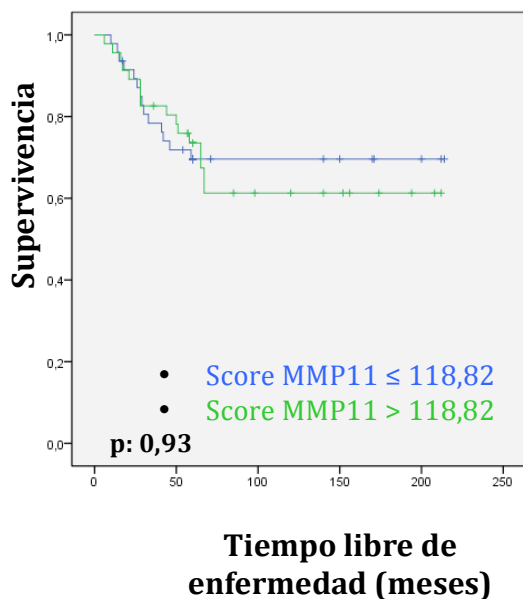
### a) Expresión global:

En la Tabla 26 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según la mediana del *score*.

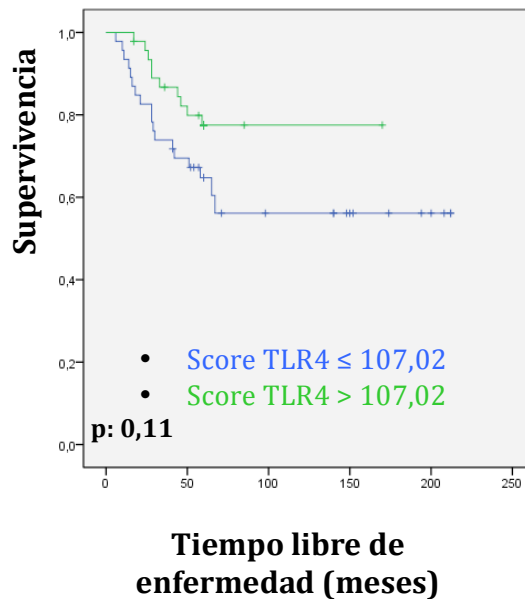
No se ha demostrado relación significativa entre la supervivencia y las factores globales (*score*). Figuras 79, 80 y 81.

**Tabla 26:** Relación entre la expresión global (*score*) de MMP11, MMP13, TLR4, y la supervivencia.

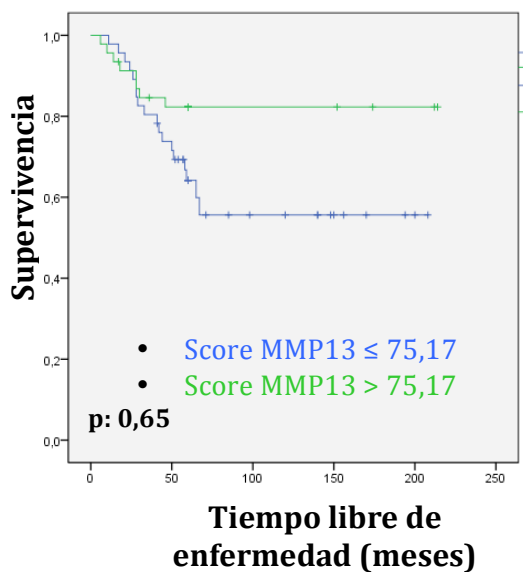
Factor	Mediana Score	N° Total	N° Eventos (%)
MMP11	≤ 118,82	47	14 (19,7)
	> 118,82	46	14 (30,4)
MMP13	≤ 75,17	46	18 (39,1)
	> 75,17	46	8 (17,3)
TLR4	≤ 107,02	46	18 (39,1)
	> 107,02	46	10 (21,7)



**Figura 79:** Curvas de supervivencia total según la expresión del score de MMP11.



**Figura 81:** Curvas de supervivencia total según la expresión del score de TLR4.



**Figura 80:** Curvas de supervivencia total según la expresión del score de MMP13.

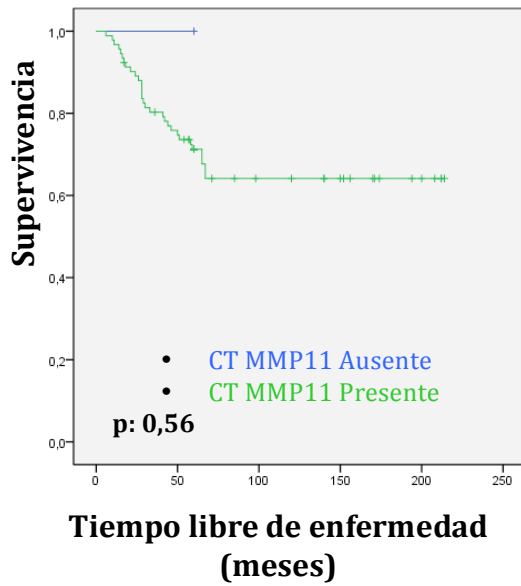
**b) Expresión por tipos celular:**

En la Tabla 27 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según los diferentes tipos celulares estudiados.

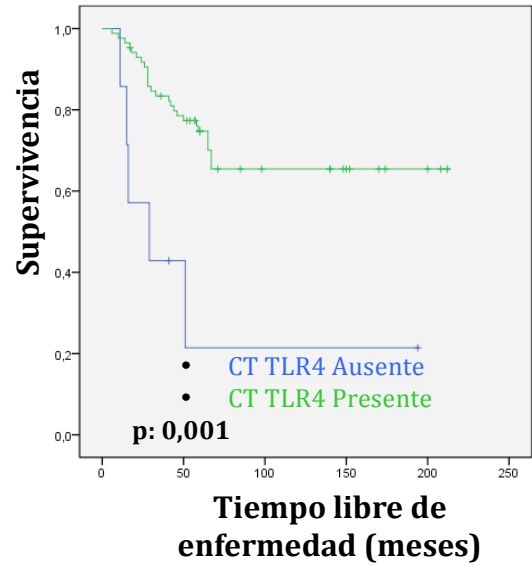
Al analizar expresión por tipo celular y la supervivencia de los pacientes, se evidenciaron resultados con relación significativa; entre la expresión por célula tumoral de TLR4 de forma positiva; y una relación negativa por fibroblastos de MMP11; figuras 84 y 85. En cuanto al resto de tipos celulares no encontramos significación estadística. Figuras 82, 83, 86 a la 90.

**Tabla 27:** Relación entre la expresión de MMP11, MMP13 y TLR4, por los diferentes tipos celulares, y la supervivencia.

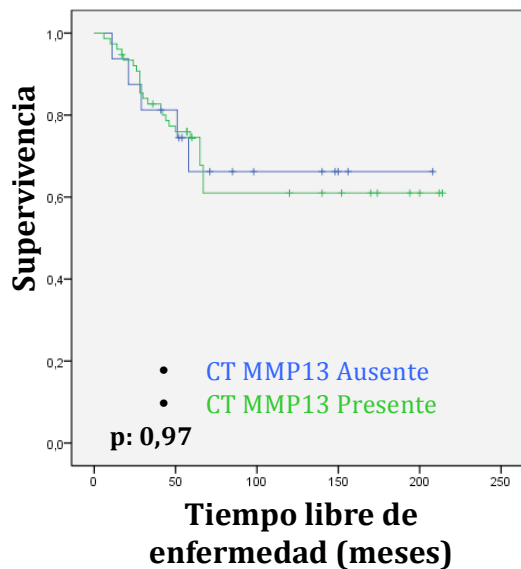
Factor		CT		FIB		CMI	
		Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)	Nº Total	Nº Eventos (%)
<b>MMP11</b>	Ausente	1	0 (0)	43	8 (18,6)	74	22 (29,7)
	Presente	92	28 (30,4)	50	20 (40)	19	6 (31,5)
<b>MMP13</b>	Ausente	16	5 (31,2)	85	25 (29,4)	66	21 (31,8)
	Presente	76	21 (27,6)	7	1 (14,2)	26	5 (19,2)
<b>TLR4</b>	Ausente	7	5 (71,4)	69	22 (31,8)	69	22 (31,8)
	Presente	85	23 (27)	23	6 (26)	23	6 (26)



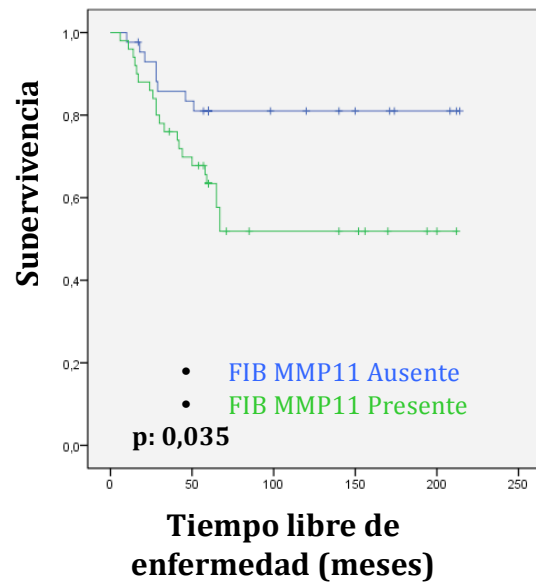
**Figura 82:** Curvas de supervivencia total según la expresión de MMP11 por las Células Tumorales.



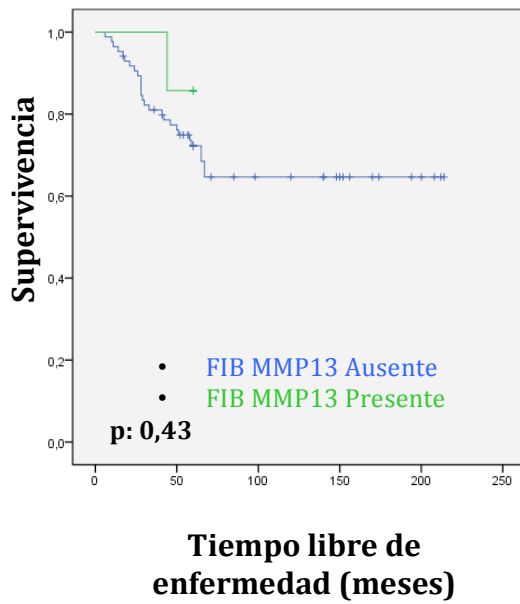
**Figura 84:** Curvas de supervivencia total según la expresión de TLR4 por las Células Tumorales.



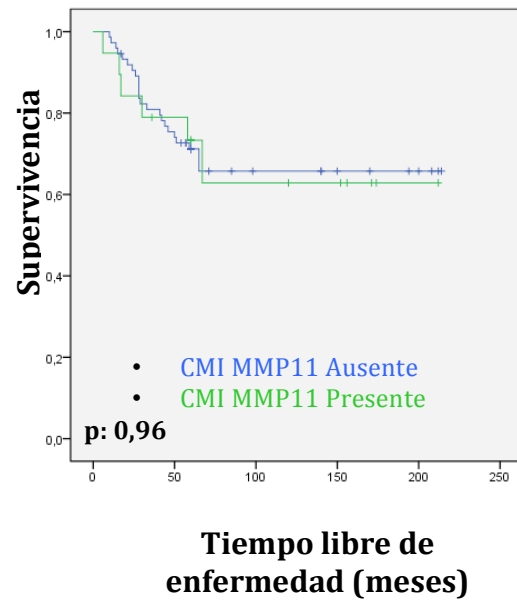
**Figura 83:** Curvas de supervivencia total según la expresión de MMP13 por las Células Tumorales.



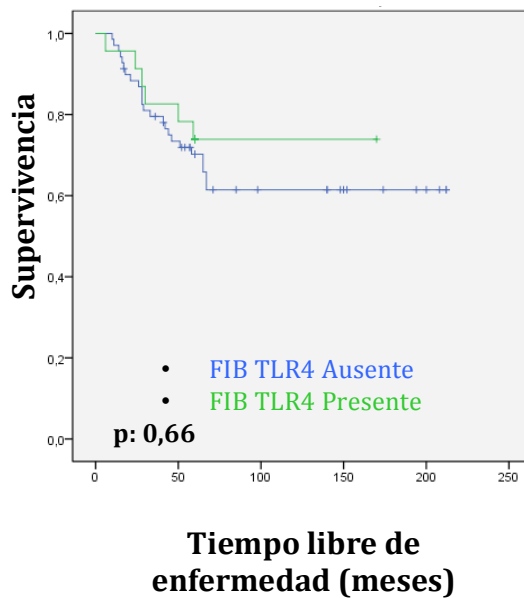
**Figura 85:** Curvas de supervivencia total según la expresión de MMP11 por los Fibroblastos.



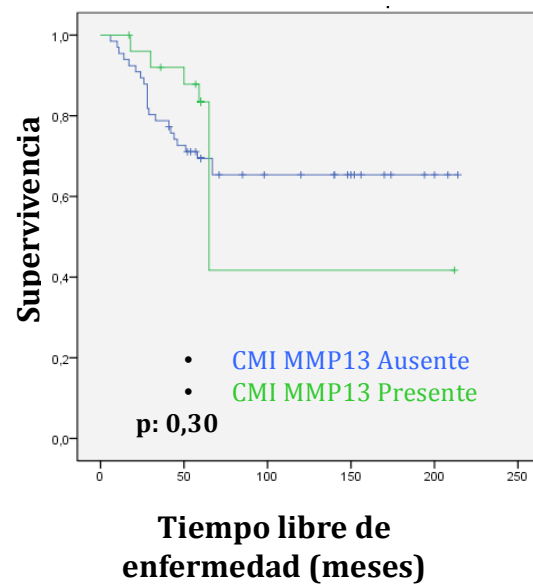
**Figura 86:** Curvas de supervivencia total según la expresión de MMP13 por los Fibroblastos.



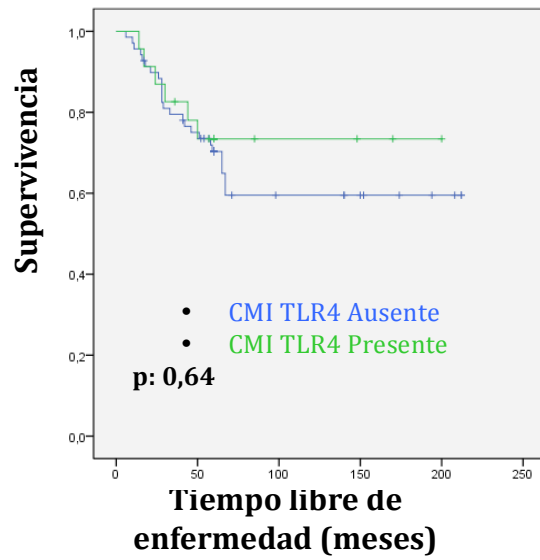
**Figura 88:** Curvas de supervivencia total según la expresión de MMP11 por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 87:** Curvas de supervivencia total según la expresión de TLR4 por los Fibroblastos.



**Figura 89:** Curvas de supervivencia total según la expresión de MMP13 por las Células Mononucleares Inflamatorias.



**Figura 90:** Curvas de supervivencia total según la expresión de TLR4 por las Células Mononucleares Inflamatorias.



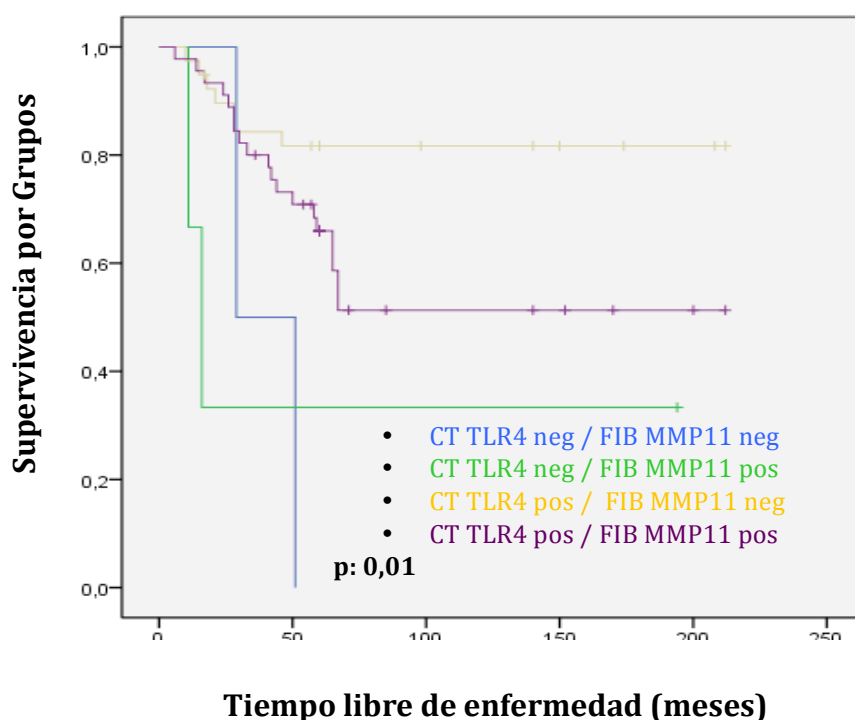
**c) Expresión por grupos:**

Se realizó además, análisis por agrupamiento de combinación de factores, como el de la expresión de TLR4 por las células tumorales y la expresión de MMP11 por los fibroblastos. En la Tabla 28 se resume el número de casos en los que se observó la expresión de los factores según los diferentes tipos celulares estudiados.

Se demostró que existe una relación estadísticamente significativa, Figura 91.

**Tabla 28:** Relación entre la expresión de TLR4 por células tumorales y MMP11 por los Fibroblastos, por agrupamiento de combinación de factores, y la supervivencia.

GRUPOS	Nº TOTAL	Nº EVENTOS (%)
CT TLR4 negativo/FIB MMP11 negativo	2	2 (100)
CT TLR4 negativo/FIB MMP11 positivo	3	2 (66,6)
CT TLR4 positivo/FIB MMP11 negativo	39	7 (17,9)
CT TLR4 positivo/FIB MMP11 positivo	45	17 (37,7)



**Figura 91:** Curvas de Supervivencia total según la expresión por grupos de MMP11 por los Fibroblastos y TLR4, por las células tumorales.

## **VI.DISCUSIÓN**

El cáncer colorrectal presenta una elevada incidencia, prevalencia y morbimortalidad a nivel mundial. En España es la neoplasia más común si consideramos ambos sexos; causando alrededor de 14.700 muertes por año, ya que apenas un 50% de los pacientes diagnosticados sobreviven a la enfermedad. (97,98)

El pronóstico de los pacientes varía notablemente según el estadio tumoral en el momento diagnóstico. Actualmente los factores pronósticos, como el estadio, el grado de diferenciación o la inestabilidad microsatélite, no son suficientes; ya que, es conocido que pacientes diagnosticados de tumores colorrectales en un mismo estadio presentan comportamientos y pronósticos muy diferentes. Por lo que surge la necesidad de búsqueda de diferentes marcadores pronósticos para poder establecer estrategias terapéuticas de forma más certera e individualizada. (99,100)

Específicamente en el estadio II del CCR, (T3N0M0, T4a-bN0M0) existen aun múltiples controversias sobre las indicaciones del tratamiento adyuvante, sin claros protocolos de actuación y con una gran variabilidad de opiniones entre diferentes centros. Se ha demostrado, que los pacientes con estadio II de “alto riesgo”, tienen inclusive peor pronóstico que pacientes con estadio IIIA. Por lo que sería recomendable una mejor identificación de estos subgrupos de pacientes; y así, poder aplicar una terapia adyuvante y seguimiento individualizado con la finalidad de incrementar su pronóstico y supervivencia global. (101)

Por otro lado, existe un grupo de pacientes con estadio II de CCR, con un menor riesgo de recurrencia tumoral en quienes, se ha observado que el beneficio de la quimioterapia adyuvante es mucho menor, obteniendo un beneficio en tan solo 2 a 3 pacientes por cada 100 tratados; y con una reducción de riesgo absoluto de tan solo un 3 a 6 % en la supervivencia a 5 años, y con un menor resultado en pacientes mayores, debido a la expectativa de vida más reducida. Otros estudios demuestran que no existe beneficio entre los pacientes con CCR estadio II, tratados con quimioterapia adyuvante vs observación, con un porcentaje de seguimiento a 5 años libres enfermedad de 76 vs 73% respectivamente; así como de 82 vs 80% en la supervivencia. La identificación de estos pacientes con menor riesgo de recurrencia, evitaría la administración de quimioterapia adyuvante innecesaria y, así, los riesgos de toxicidad hematológica (neutropenia en un 41,1%), neurológica

(neuropatía en un 12,4%), digestiva (diarrea y deshidratación grave 32,2%), entre otros. De momento, la decisión de aplicar tratamiento adyuvante se basa en datos clínicos y anatomopatológicos (estadio tumoral, grado de diferenciación histológica, estabilidad microsatélite) que son insuficientes. (102-106)

Múltiples estudios ha demostrado que las células inflamatorias del estroma poseen un papel destacado en la progresión tumoral. El crecimiento tumoral y la invasión se asocian a muerte celular por apoptosis y necrosis; esta muerte genera, a su vez, liberación de mediadores inflamatorios que son potentes estimuladores de macrófagos. Por otra parte, las propias células tumorales inducen inflamación y producción de citocinas y quimiocinas, reclutando así diversos tipos de células inflamatorias. (107)

De esta forma, se ha demostrado por varios trabajos, que la infiltración tumoral de macrófagos se asocia con una mayor agresividad tumoral, así como una mayor progresión. Todos estos datos apoyan a la hipótesis de que la inflamación prolongada mantiene una respuesta inmune que puede perturbar el microambiente celular y producir un daño a nivel celular con la modificación de proteínas que están involucradas en el ciclo celular, reparación del ADN y la apoptosis. Además, la infiltración en el tumor por los leucocitos son un mecanismo de defensa intrínseca contra el desarrollo de tumores; sin embargo esta propia infiltración podría promover la angiogénesis, el crecimiento y la invasión tumoral por medio de la secreción de citoquinas y proteasas que estimulan el potencial invasivo y proliferativo. (80,108)

Por lo tanto, la progresión tumoral es el resultado de un proceso complejo todavía no conocido del todo, sobre la interrelación entre el tejido tumoral y el tejido sano o "*microambiente*", en el cual las células sufren cambios en su fenotipo y adoptan las características especiales que les permiten invadir y diseminarse a tejidos distantes.

Dentro de este microambiente encontramos a las MMPs y sus inhibidores (TIMPs), ellos son parte de los principales influyentes en el comportamiento tumoral. Así su acción sobre la degradación, remodelación de estroma, así como fuente en la producción de citoquinas y señales inflamatorias, ayudaran al crecimiento de las células tumorales. (85,109-111)

Se ha demostrado que, además de afectar el comportamiento de las células tumorales, las MMPs las hacen resistentes a las señales apoptóticas. Múltiples estudios demuestran que la presencia de expresiones elevadas de MMPs en varios tipos de tumores, incluyendo el CCR en estadio II, se correlacionan con un peor pronóstico y una menor supervivencia. (112-118)

Otros de los componentes a destacar sobre la inflamación relacionada con la carcinogénesis, son los Receptores Tipo Toll (TLR). Estos tienen la función de protección innata y adquirida por medio de reconocimiento de virus, bacterias, así como de señales de daño celular y necrosis. (119,120). Estudios experimentales demuestran que los TLRs han sido relacionados con la adhesión de las células tumorales y progresión, así como también efectos apoptóticos y anticancerígenos. Existe evidencia que demuestra que los TLRs tienen relación con el pronóstico de varios tumores y dentro de estos específicamente con el de CCR en el estadio II. (121-124)

Por lo que el objetivo de nuestro estudio es de analizar las expresiones de MMP11, MMP13 y TLR4, en los tumores resecados de pacientes con cáncer de colon en estadio II, por los antecedentes anteriormente señalados.

La MMP 11 o Estromelina 3, esta implicada en la degradación de la matriz extracelular, la remodelación de los tejidos y la curación de heridas. Su función en diferentes enfermedades es aun desconocido; sin embargo, estudios demuestran que niveles altos de MMP11 han sido asociados a progresión tumoral y malos pronósticos de algunos carcinomas (125-130). El grupo de Vizoso *et al* en su estudio en pacientes con CCR resecable, demuestra que el aumento de la expresión de MMP11 por los fibroblastos del estroma, se asociado a un peor pronóstico de los pacientes (72). Otros estudios similares donde evalúan los fibroblastos localizados en la cercanía del tumor, concluyen con resultados similares encontrando que existe relación de estos con el pronóstico y recurrencia tumoral. (131,132)

En nuestro estudio, al analizar la expresión de MMP11 de forma global y por los tipos celulares (célula tumoral, fibroblastos y célula mononuclear inflamatoria), pudimos comprobar que el aumento de la expresión de MMP11 por los fibroblastos del estroma se asocia a un mayor porcentaje de metástasis a distancia,

así como también a la aparición específicamente de metástasis hepáticas. Estos resultados son concordantes con otros estudios descritos. (133)

Otro dato importante de nuestros resultados es la relación entre la expresión de MMP11 por los fibroblastos del estroma y una menor supervivencia global de los pacientes. Eiró *et al*, en su estudio demuestra resultados similares, donde analizan la expresión de MMP11 por los fibroblastos de la matriz en el CCR (72). Existen, además, otros trabajos, donde se evalúa la expresión de MMP11 en el suero de los pacientes, encontrando una relación similar con una menor supervivencia global (134). La expresión de MMP11 se ha visto asociada en el crecimiento y desarrollo de adenoma-adenocarcinoma, así como en estadios iniciales del desarrollo de CCR; su aumento se relaciona con el crecimiento tumoral infiltrante y la estabilidad de los microsatélites, por lo tanto mal pronóstico. (135-137)

Estos importantes hallazgos reafirman que el estroma tiene un papel activo muy importante en la progresión tumoral, su invasión y las metástasis. En los últimos años se han ido acumulando evidencias que indican que los cambios en el comportamiento biológico de tumor son debidos en gran parte a esta interacción tumor-estroma.(138-140)

Existe, además, evidencia que sugieren que la expresión de MMP11 por los fibroblastos, podría ser utilizada como una nueva posible diana para el desarrollo de vacunas y terapia inmunológica antitumoral. (141)

Otro de los factores analizados fue la MMP13 o Colagenasa 3. Se trata de una metaloproteasa con un importante componente degradativo sobre la matriz extracelular. Participa en procesos fisiológicos como la osificación fetal, ovulación, involución uterina, entre otros. Se ha demostrado también que está relacionada con múltiples patologías como la artritis reumatoide, aneurisma aórtico, arteriosclerosis, etc. Además de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos, la MMP13 desempeña un papel en la carcinogénesis, actuando sobre los procesos de degradación y remodelación tisular. En el cáncer gástrico y en el colorrectal se relaciona su expresión con una mayor agresividad tumoral, con desarrollo de metástasis hepáticas y peor pronóstico; y se propone que podría servir como un marcador pronóstico. (142-145)

En los análisis que hemos realizado en nuestro estudio no se han podido

demostrar relaciones significativas, entre la expresión de MMP13 con las características clínico-patológicas de los pacientes, tanto de forma global, como por tipo celular.

En lo que respecta al otro de los factores objeto de nuestro trabajo, el TLR4, estudios experimentales sugieren que la activación de TLRs tiene un papel importante aunque todavía no del todo conocido, con la inflamación asociada a cáncer; demostrando un efecto a favor de la carcinogénesis, así como también un papel protector. (119) Dentro de la patología intestinal, como es la colitis crónica, se ha demostrado que la presencia de TLR4 esta asociada a mayor desarrollo de carcinoma, y que su inhibición podría ser de ayuda para el tratamiento y la prevención de esta patología, también existe evidencia que su expresión se asocia a un aumento del riesgo de malignización de pólipos. (84,146,147)

En nuestro estudio hemos encontrado resultados importantes. Demostramos que la expresión de TLR4 por parte de las células tumorales, esta asociado a una menor recurrencia tumoral global, así como también a la menor tasa de recurrencia a distancia y la aparición de carcinomatosis peritoneal.

En cuanto a la supervivencia, nuestros resultados demostraron que existe una relación entre la expresión de TLR4 por las células tumorales y una mayor supervivencia de los pacientes.

Con estos resultados, se realizó además el análisis combinado por grupos; asociando la expresión de TLR4 por las células tumorales con la expresión de MMP11 por los fibroblastos del estroma, y se encontró que esa combinación contribuye a una mejor evolución pronóstica.

Estos resultados se correlacionan con un trabajo similar publicado por Eiró *et al*, donde se asocia al aumento de la expresión de TLR4 por las células tumorales con una menor probabilidad de recurrencia tumoral. (85) Existen amplias evidencias que demuestra que el TLR4 han sido relacionada con la carcinogénesis de CCR, así como su función en la respuesta inmune como un mecanismo protector. Según su expresión por las células del epitelio normal, células del microambiente tumoral o por las propias células tumorales, se muestran diferentes resultados en cuanto a la progresión tumoral y pronóstico; por lo que se ha comprobado que el TLR4 tiene un papel tanto “*pro*” como “*anti-cancerígeno*”.(148-151)

Así pues la asociación de TLR4 y cáncer, se podría entender de varias maneras. Por una parte, tenemos que la activación persistente de TLR4, desencadena una inflamación crónica con sus efectos carcinogénicos; así como la evidencia que demuestra que su inhibición disminuye el potencial invasivo de las células. (152) Por otra parte, estudios en ratones con un déficit de TLR4, demostraron que existió un incremento en el desarrollo tumoral; y que su inhibición en estos, aumenta las metástasis por cáncer de mama.(153-155)

En el tratamiento adyuvante, se ha demostrado que el aumento de expresión de TLR4 en los pacientes con CCR que recibieron quimioterapia, por mecanismos de fosforilación podrían inducir a una evasión de la apoptosis y por lo tanto una resistencia al tratamiento; por lo que terapias inhibitoras de este proceso podrían mejorar la eficacia en el tratamiento quimioterápico. (156)

Podemos concluir, a la vista de nuestros resultados, que el análisis de la expresión de MMP11 y TLR4 podrían tener gran utilidad, en los pacientes con CCR estadio II, con una repercusión en su tratamiento, pronóstico y supervivencia. Por lo que creemos resultaría de gran interés la realización de futuros estudios similares en otras poblaciones de pacientes para ampliar estos resultados.



## **VII.CONCLUSIONES**

- Al analizar los valores de expresión global (*score*) de los factores a estudio (MMP11, MMP13 y TLR4), y las características clinicopatológicas de los pacientes con CCR con estadio II, se encontró una relación significativa con la edad; demostrando que los pacientes de edad más avanzada mostraron valores más elevados de expresión global de TLR4; el resto de características no se demostró relaciones significativas.
- En el estudio de las expresiones por tipo celular, existe relación significativamente negativa entre la expresión de TLR4 por las células tumorales, y la recurrencia global, la recurrencia a distancia y la aparición de carcinomatosis.
- Al evaluar la expresión por tipos celulares del estroma (Fibroblastos y Células Mononuclear Inflamatorias), existió relación significativamente positiva entre la expresión de MMP11 por los fibroblastos y la aparición de metástasis hepáticas, así como con la recurrencia a distancia.
- En el estudio de supervivencia se observa que tanto la ausencia de la expresión de TLR4 por las células tumorales, así como la presencia de expresión de MMP11 por los fibroblastos, se asociaron a una menor supervivencia de los pacientes operados de CCR en estadio II.
- Al realizar el análisis asociado por grupos según las expresiones por tipos celulares, se observa que existe relación significativa entre las expresiones de TLR4 por las células tumorales y la expresión de MMP11 por los fibroblastos del estroma; demostrándose que el grupo con mayor supervivencia es cuando la expresión de TLR4 es positiva y la expresión de MMP11 es negativa.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Asociación Española de Cirujanos. Cirugía AEC. 2nd ed. Parrilla Paricio P, Landa García JI, editors. Madrid: Médica Panamericana; 2009.
2. Guías Clínicas de la Asociación Española de Cirujanos. Cirugía Colorrectal. 2nd ed. Ortiz Hurtado H, editor. Madrid: ARÁN; 2012.
3. aecc. Asociación Española Contra el Cáncer. [Online].; 2014 [cited 2015 Marzo. Available from: HYPERLINK <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdecolon/Paginas/incidencia.aspx> .
4. Lejeune C, Sassil F, Ellis L, et al. Socio-economic disparities in access to treatment and their impact on colorectal cancer survival. *Int J Epidemiol*. 2010 junio; 39(3): p. 710-717.
5. Mitry E, Racht B. Prognosis of colorectal cancer and socio-economic inequalities. *Gastroenterol Clin Biol*. 2006 Abril; 30(4): p. 598-603.
6. González CA. Nutricion and cancer: the current epidemiological evidence. *Br J Nutr*. 2006 Agosto; 99(Supplement S1): p. S42-S45.
7. Kim J, Choi Y, Kwon H, et al. Simple colonoscopy reporting system checking the detection rate of colon polyps. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug; 21(31): p. 9380-9386.
8. Lin O. Computed tomographic colonography: Hope or hype? *World J Gastroenterol*. 2010 Febrero; 16(8): p. 915-920.
9. Poeppel T, Krause B, Heusner T, et al. PET/CT for the staging and follow-up of patients with malignancies. *Eur J Radiol*. 2009 Junio; 70(3): p. 382-392.
10. Suárez J, Maldonado A, Domínguez M, et al. La Tomografía por Emisión de Positrones (PET) en la práctica clínica oncológica. *Oncología (Barcelona)*. 2004 Ago; 27(8): p. 15-25.
11. Carriquiry L, Piñeyro A. Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum*. 1999 July;(42): p. 921-929.
12. Bannura G, Cumsille M, Contreras J, et al. Antígeno carcinoembrionario preoperatorio como factor pronóstico independiente en cáncer de colon y recto. *Rev Med Chile*. 2004 Junio; 6(132): p. 691-700.
13. Wang W, Lin J, Chiou T, et al. CA19-9 as the most significant prognostic indicator of metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2002 January; 49(43): p. 160-164.
14. Organización Mundial de Gastroenterología. Tamizaje del cáncer colorrectal. In *Guías Prácticas de la Alianza Internacional para Cáncer Digestivo* ; 2007. p. 1-19.
15. American Joint Commitee on Cancer. 7th Edition. In *Colon and Rectum Cancer Staging*; 2009. p. 1.
16. Ochy D, Hyman N, Simmang C, et al. Practice Parameters for Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2004 Agus; 47(8): p. 1269-1284.
17. American Cancer Society. American Cancer Society. [Online].; 2015 [cited 2015 octubre 5. Available from: HYPERLINK [www.cancer.org](http://www.cancer.org) .

18. Wolpin B, Meyyerhardt J, Mamon H, et al. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2007 May; 57(3): p. 168-185.
19. Kopetz S, Freitas D, Calabrich A, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Oncology (Williston Park).* 2008 Mar; 22(3): p. 260-270.
20. National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology, Colon cancer V3.2010. [Online].; 2010 [cited 2016 Jun 5. Available from: HYPERLINK [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/colon.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/colon.pdf) .
21. Chau I, Norman A, Cunningham D, et al. Longitudinal quality of life and quality adjusted survival in a randomised controlled trial comparing six months of bolus fluorouracil/leucovorin vs. twelve weeks of protracted venous infusion fluorouracil as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2005 Jul; 41(11): p. 1551-1559.
22. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. the Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators: Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun; 350(23).
23. Comptom CC, Tabane KK. Uptodate. [Online].; 2015 [cited 2015 Agus 3. Available from: HYPERLINK "www.uptodate.com" www.uptodate.com .
24. Saha S, Dan A, Viehl C, et al. Sentinel lymph node mapping in colon and rectal cancer: its impact on staging, limitations, and pitfalls. *Cancer Treat Res.* 2005;(127): p. 105-122.
25. Cruz-Bustillo D. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev. esp. enferm. diges.* 2004 enero; 96(1): p. 48-59.
26. Menéndez P, Villarejo P, Padilla D, et al. Carcinogenesis del Cáncer Colorrectal. *Rev Esp Invest Quir.* 2012; 15(1): p. 27-34.
27. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Bases moleculares del cáncer colorrectal: ¿Hacia un manejo individualizado? *Rev. esp. enferm. dig.* 2011 Enero; 103(1): p. 29-35.
28. Palacio K, Muñeton C. Bases Moleculares del Cáncer de Colon. *IATREIA.* 2012 Abril; 25(2): p. 137-148.
29. Al-Sohaily S, Bianki A, Leong R, et al. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Sep; 27(9): p. 1423-1431.
30. Huh J, Kim H, Kim Y. Prognostic value of perineural invasion in patients with stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010 Aug; 17(8): p. 2066-2072.
31. Newland R, Dent O, Chapuis P, et al. Survival after curative resection of lymph node negative colorectal carcinoma. *Cancer.* 1995 August; 76(4): p. 564-571.
32. Jass J, O`brine M, Riddell R, et al. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. *Human Pathology.* 2007 April; 38(4): p. 538-545.
33. Huh J, Kim H, Kim Y, et al. Prognostic value of perineural invasion in patients with stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010 Agosto; 17(8): p. 2066-2072.
34. López A. Análisis de la expresión génica global en pacientes con cáncer

- colorrectal: Clasificación, significado biológico y relevancia clínica. Tesis. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular; 2010.
35. Benatti P, Gafá R, Barana D, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res.* 2006 Jun; 12(12): p. 3868-3869.
  36. Popat S, Hubner R, Houlston R. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005 Jan; 20(23): p. 609-618.
  37. Fearon E, Cho K, Nigro J, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science.* 1990 Jan; 247(4928): p. 49-56.
  38. Shibata D, Reale M, Lavin P, et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1996 Dec; 335(23): p. 1727-1732.
  39. Popat S, Houlston R. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 2005 Sep; 41(14): p. 2066-2070.
  40. Díez M, Pollán M, Ramos P, et al. Variation in the prognostic value of p53 protein in relation to tumoral stage in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cir Esp.* 2005 Apr; 77(4): p. 213-220.
  41. Wang J, Wang Y, Jao S, et al. Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene. *Oncol Rep.* 2006 Dec; 16(6): p. 1245-1252.
  42. Conlin A, Smith G, Carey F, et al. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut.* 2005 Sep; 54(9): p. 1283-1286.
  43. Hsieh J, Lin S. APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am Surg.* 2005 Apr; 71(4): p. 336-343.
  44. Öhrling K, Karlberg M, Edler D, et al. A combined analysis of mismatch repair status and thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2013 Jun; 12(2): p. 128-35.
  45. Ellina M, Bouris P, Aletras A, et al. EGFR and HER2 exert distinct roles on colon cancer cell functional properties and expression of matrix macromolecules. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug; 1840(8): p. 2651-2661.
  46. Iinuma H, Okinaga K, Egami H, et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2006 Feb; 28(2).
  47. Navarro S, Pérez-Segura P, Ramón y Cajal S, et al. Recomendación para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal. Consenso Nacional de la Sociedad Española ~ de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española ~ de Oncología Médica. *Rev Esp Patol.* 2012 May; 45(3): p. 130-144.
  48. American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology.* 2001 Jul; 121(1): p. 195-197.
  49. Lynch H, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl J Med.* 2003 Mar; 348(10): p. 919-932.
  50. Balamaña J, Stockwell D, Steyerberg E, et al. Prediction of MLH1 and MSH2

- mutations in Lynch syndrome. *JAMA*. 2006 Sep; 296(12): p. 1469-1478.
51. O'connell M, Lavery I, Yothers G, et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol*. 2010 Agus; 28(25): p. 3937-3944.
  52. Gray R, Quirke P, Handley K, et al. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Dec; 29(35): p. 4611-4619.
  53. Salazar R, Roepman P, Capella G, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Jan; 29(1): p. 17-24.
  54. Hernández-Losa J, Sanz J, Landolfi S, et al. Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. *Rev Esp Patol*. 2012 Feb; 45(2): p. 76-85.
  55. Balschun K, Haag J, Wenke A, et al. KRAS, NRAS, PIK3CA exon 20, and BRAF genotypes in synchronous and metachronous primary colorectal cancers diagnostic and therapeutic implications. *J Mol Diagn*. 2011 Jul; 13(4): p. 436-445.
  56. Álvaro T, Noguera-Salvá R, Fariñas-Guerrero F. La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral. *Rev Esp Patol*. 2010 Ener; 43(1): p. 24-32.
  57. Eiró N, Vizoso F. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2012 Mar; 4(3): p. 62-72.
  58. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar; 144(5): p. 646-677.
  59. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014 Jul; 211(8): p. 1503-1523.
  60. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth F. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan; 1803(1): p. 20-28.
  61. Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V. Rol de las Metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Med (B Aires)*. 2012 Abril; 72(6): p. 495-502.
  62. González-Avila G, González A, Delgado J, et al. Participación de las metaloproteasas de matriz en la progresión del cáncer. *Rev Ist Nal Enf Resp Mex*. 2009 Dic; 22(4): p. 328-336.
  63. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar; 2(3): p. 161-174.
  64. Shuai M, Shi-Yao Z, Chun-Shan H, et al. Clinicopathological significance of matrix metalloproteinase-7 protein expression in esophageal cancer: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Jul; 9: p. 3729-3740.
  65. Kubben J, Sier C, Meljer M, et al. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2006 Sep; 95(6): p. 744-751.
  66. Eiró N, Fernández-García B, Vázquez J, et al. A phenotype from tumor stroma based on the expression of metalloproteases and their inhibitors, associated

- with prognosis in breast cancer. *Oncoimmunology*. 2015 Jan; 4(7): p. e992222. eCollection 2015.
67. Eiró N, Vizoso F. Importance of tumor/stroma interactions in prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014 Apr; 3(2): p. 98-101.
  68. Altadill A, Rodríguez M, González L, et al. Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2009 Oct; 41(10): p. 740-748.
  69. Fields G. New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix Biol*. 2015 May; 44: p. 239-246.
  70. Seon-Lago J, Seoane S, Eiró N, et al. Cancer progression by breast tumors with Pit-1-overexpression is blocked by inhibition of metalloproteinase (MMP)-13. *Breast Cancer Res*. 2014 Dec; 16(6): p. 505.
  71. Altadill A, Eiró N, González L, et al. Comparative analysis of the expression of metalloproteases and their inhibitors in resected crohn`s disease and complicated diverticular disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Jan; 18(1): p. 120-130.
  72. González L, Eiró N, González L, et al. Effect of the expression of matrix metalloproteases and their tissue inhibitors on survival of patients with resectable colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 2012 Aug; 57(8): p. 2063-2071.
  73. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct; 388(4): p. 621-625.
  74. Mesa-Villanueva M, Patiño PJ. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología*. 2006 Abril; 25(2): p. 115-130.
  75. García L, Villalobos A, Islas A, et al. El modelo del peligro: la importancia de los receptores tipo Toll en la inmunidad innata. *Investugación en Salud*. 2008 Abr; 10(1): p. 26-33.
  76. Villalobos A, Huizar M, Aceves M, et al. El modelo del peligro: la importancia de los receptores tipo Toll en la inmunidad innata. *Investigación en Salud*. 2008 Abril; 10(3): p. 26-33.
  77. Vaz J, Akbasshahi H, Andersson R. Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis. *World J Gastroenterology*. 2013 Feb; 19(5): p. 616-630.
  78. Hackam D, Good M, Sodhi C. Mechanisms of gut barrier failure in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors throw the switch. *Semin Pediatr*. 2013 May; 22(2): p. 76-82.
  79. Flack-Hansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2013 Jul; 14(7): p. 14008-14023.
  80. Eiró N, Vizoso F. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2012 Mar; 4(3): p. 62-72.
  81. Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*. 2008 Dec; 130(6): p. 1091-1103.
  82. Fukata M, Chen A, Vamadevan A, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 2007 Dec; 133(6): p. 1869-1881.

83. Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. *J Transl Med.* 2010 Nov; 8(112): p. 10.1186/1479-5876-8-112.
84. Eiró N, González L, González L, et al. Study of the expression of toll-like receptors in different histological types of colorectal polyps and their relationship with colorectal cancer. *J Clin Immunol.* 2012 Aug; 32(4): p. 848-854.
85. Eiró N, González L, González L, et al. Toll-like receptor-4 expression by stromal fibroblasts is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Immunother.* 2013 Jul; 36(6): p. 342-349.
86. Wang E, Qian Z, Nakasono M, et al. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2010 Mar; 102(5): p. 908-915.
87. Wolska A, Lech-Maranda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett.* 2009 Dec; 14(2): p. 248-272.
88. Yu L, Che S. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Sep; 57(9): p. 1271-1278.
89. Huang B, Zhao J, Unkeless J, et al. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene.* 2008 Jan; 27(2): p. 218-224.
90. He W, Lin Q, Wang L, et al. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol.* 2007 Apr; 44(11): p. 2850-2859.
91. Baylin S, Criekinge W, Schuebel K, et al, inventors; Early detection and prognosis of colon cancers. US Patent application patent 20080085867. 2008.
92. Hoon D, Goto Y, inventors; Functional toll-like receptors (TLR) on melanocytes and melanoma cells and uses thereof. US Patent application patent 20090011418. 2009.
93. Lionel A, Guido K, Laurence Z, inventors; Toll like receptor 4 dysfunctions and the biological applications thereof. WO patent WO2008009693. 2008.
94. So E, Ouchi T. The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci.* 2010 Nov; 6(7): p. 675-681.
95. Instituto Nacional del Cáncer. NIH. [Online].; 2013 [cited 2016 Enero 11. Available from: [HYPERLINK http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-terapias-biologicas-respuestas](http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-terapias-biologicas-respuestas) .
96. Jäger D. Cancer Research Institute. [Online].; 2015 [cited 2016 Enero 11. Available from: [HYPERLINK http://www.cancerresearch.org/cancer-immunotherapy/impacting-all-cancers/colorectal-cancer](http://www.cancerresearch.org/cancer-immunotherapy/impacting-all-cancers/colorectal-cancer) .
97. Sociedad Española Oncología Médica. Las cifras del Cáncer en España 2014. [Online].; 2014 [cited 2016 Junio 24. Available from: [HYPERLINK http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las\\_cifras\\_del\\_cancer\\_2014.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_cifras_del_cancer_2014.pdf) .
98. Bray F, Ren J, Masuyer E, et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer.* 2013 Mar; 132(5): p. 1133-



- 1145.
99. Protic M, Stojadinovic A, Nissan A, et al. Prognostic Effect of Ultra-Staging Node-Negative Colon Cancer Without Adjuvant Chemotherapy: A Prospective National Cancer Institute-Sponsored Clinical Trial. *J Am Coll Surg*. 2015 Sep; 221(3): p. 643-651.
  100. Zhang Y, Ma J, Zhang S, et al. A prognostic analysis of 895 cases of stage III colon cancer in different colon subsites. *Int J Colorectal Dis*. 2015 Sep; 30(9): p. 1173-11183.
  101. Lee Y, Kim H, Jung K, et al. Oncologic Outcomes of Stage IIIA Colon Cancer for Different Chemotherapeutic Regimens. *J Korean Soc Coloproctol*. 2012 Oct; 28(5): p. 259-264.
  102. Group QC, Gray R, Barnwell J, McConkey C, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007 Dec; 370(9604): p. 2020-2029.
  103. Gill S, Laprinzi C, Sargent D, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol*. 2004 May; 22(10): p. 1797-1806.
  104. Cen P, Lui C, Du X. Comparison of toxicity profiles of fluorouracil versus oxaliplatin regimens in a large population-based cohort of elderly patients with colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2012 Jun; 23(6): p. 1503-1511.
  105. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun; 350(23): p. 2343-2351.
  106. Sharif S, O'Connell M, Yothers G, et al. FOLFOX and FLOX Regimens for the Adjuvant Treatment of Resected Stage II and III Colon Cancer. 2008 Nov; 26(9): p. 956-963.
  107. González L, González-Reyes S, Marín L, et al. Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumour stromal mononuclear inflammatory cells and those at the invasive front of breast carcinomas. *Histopathology*. 2010 Dec; 57(6): p. 862-876.
  108. Díaz González D. Estudio de Validación de la Expresión de la Metaloproteasa-1 como predictor de la afectación tumoral de los ganglios no centinela en el Cáncer de Mama [TESIS DOCTORAL] Oviedo: Universidad de Oviedo; 2016.
  109. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May; 6(5): p. 392-401.
  110. Jodele S, Blavier L, Yoon J, et al. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Mar; 25(1): p. 35-43.
  111. Sotelo Lezama M. Papel de las células tumorales circulantes en la identificación de subgrupos pronósticos en pacientes con cáncer de colon estadio III [TESIS DOCTORAL] Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2014.
  112. Nelson A, Fingleton B, Rothenberg M, et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2000 Mar; 18(5): p. 1135-1149.

113. Fingleton B, Vargo-Gogola T, Crawford H, et al. Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. *Neoplasia*. 2001 Nov; 3(6): p. 459-468.
114. Chen R, Cui J, Xu C, et al. The significance of MMP-9 over MMP-2 in HCC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jul; Suppl3(S3): p. 375-384.
115. Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, et al. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2003 Feb; 103(5): p. 647-651.
116. Pellikainen J, Ropponen K, Kataja V, et al. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov; 10(22): p. 7621-7628.
117. Murray G, Duncan M, O'neil P, et al. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat med*. 1996 Apr; 2(4): p. 461-462.
118. Akishima-Fukasawa Y, Ishikawa Y, Akasaka Y, et al. Histopathological predictors of regional lymph node metastasis at the invasive front in early colorectal cancer. *Histopathology*. 2011 Sep 59; 3(470-481).
119. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jan; 9(1): p. 57-63.
120. Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul; 454(7203): p. 436-444.
121. O'Leary D, Bhatt L, Woolley J, et al. TLR-4 signalling accelerates colon cancer cell adhesion via NF- $\kappa$ B mediated transcriptional up-regulation of Nox-1. *PloS One*. 2012 Oct; 7(10): p. e44176.
122. Grimm M, Kim M, Rosenwald A, et al. Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumorigenesis and tumour progression. *Eur J Cancer*. 2010 Oct; 46(15): p. 2849-2857.
123. Rayburn E, Wang W, Zhang R, et al. Experimental therapy for colon cancer: anti-cancer effects of TLR9 agonism, combination with other therapeutic modalities, and dependence upon p53. *Int J Oncol*. 2007 Jun; 30(6): p. 1511-1519.
124. Castro F, Försti A, Buch S, et al. TLR-3 polymorphism is an independent prognostic marker for stage II colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2011 May; 47(8): p. 1203-1210.
125. Soni S, Mathur M, Shukla N, et al. Stromelysin-3 expression is an early event in human oral tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2003 Nov; 107(2): p. 309-316.
126. Lochter A, Werb Z, Bissell M. Transcriptional regulation of stromelysin-1 gene expression is altered during progression of mouse mammary epithelial cells from functionally normal to malignant. *Matrix Biol*. 1999 Oct; 18(5): p. 455-467.
127. Nakopoulou L, Panayotopoulou E, Giannopoulou I, et al. Stromelysin-3 protein expression in invasive breast cancer: relation to proliferation, cell survival and patients' outcome. *Mod Pathol*. 2002 Nov; 15(11): p. 1154-1161.

128. Cribier B, Noacco G, Peltre B, et al. Expression of stromelysin 3 in basal cell carcinomas. *Eur J Dermatol*. 2001 Nov; 11(6): p. 530-533.
129. Delebecq T, Porte H, Zerimech F, et al. Overexpression level of stromelysin 3 is related to the lymph node involvement in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Mar; 6(3): p. 1086-1092.
130. Zhaos Z, Chu Y, Ye Z, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase 11 in human gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *Hum Pathol*. 2010 May; 41(5): p. 686-696.
131. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr; 13(7): p. 2082-2090.
132. Guo X, Oshima H, Kitmura T, et al. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J Biol Chem*. 2008 Jul; 283(28): p. 19864-19871.
133. Porte H, Chastre E, Prevot S, et al. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer*. 1995 Feb; 64(1): p. 70-75.
134. Pang L, Wang D, Zhang N, et al. Elevated serum levels of MMP-11 correlate with poor prognosis in colon cancer patients. 2016 Mar; 16(4): p. 599-607.
135. Skoglund J, Emterling A, Arbman G, et al. Clinicopathological significance of stromelysin-3 expression in colorectal cancer. *Oncology*. 2004; 67(1): p. 67-72.
136. Urbanski S, Edwards D, Hershfield N, et al. Expression pattern of metalloproteinases and their inhibitors changes with the progression of human sporadic colorectal neoplasia. *Diagn Mol Pathol*. 1993 Jun; 2(2): p. 81-89.
137. Mysliwiec A, Ornstein D. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2002 Feb; 1(4): p. 208-219.
138. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010 Apr; 141(1): p. 52-67.
139. Bhowmick N, Neilson E, Moses H. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004 Nov; 433(7015): p. 332-337.
140. Alexander C, Werb Z. Targeted disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinases gene increases the invasive behavior of primitive mesenchymal cells derived from embryonic stem cells in vitro. *J Cell Biol*. 1992 Aug; 118(3): p. 727-739.
141. Peruzzi D, Mori F, Conforti A, et al. MMP11: a novel target antigen for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2009 Jun; 15(12): p. 4104-4013.
142. del Cazar J, Vizoso F, González L, et al. Expression and clinical significance of collagenase-3 (MMP-13) in gastric cancer. *Gastroenterol Hepatol*. 2003 Jan; 26(1): p. 1-7.
143. Leeman M, McKay J, Murray G. Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Oct; 55(10): p. 758-762.
144. Yamada T, Oshima T, Yoshihara K, et al. Overexpression of MMP-13 gene in colorectal cancer with liver metastasis. *Anticancer Res*. 2010 Jun; 30(7): p.

- 2693-2699.
145. Huang M, Chang H, Chung F, et al. MMP13 is a potential prognostic marker for colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2010 Nov; 24(5): p. 1241-1247.
  146. Fukata M, Chen A, Vamadevan A, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology.* 2007 Dec; 133(6): p. 1869-1881.
  147. Khan M, Ma C, Knodler L, et al. Toll-like receptor 4 contributes to colitis development but not to host defense during *Citrobacter rodentium* infection in mice. *Infect Immun.* 2006 May; 74(5): p. 2522-2536.
  148. Simiantonaki N, Kurzik-Dumke U, Karyofylli G, et al. Reduced expression of TLR4 is associated with the metastatic status of human colorectal cancer. *Int J Mol Med.* 2007 Jul; 20(1): p. 21-29.
  149. Yesudhas D, Gasu V, Anwar M, et al. Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front Immunol.* 2014 Jul; 15(5): p. 334.
  150. Kutikhin A, Yuzhalin A, Volkov A, et al. Correlation between genetic polymorphisms within IL-1B and TLR4 genes and cancer risk in a Russian population: a case-control study. *Tumour Biol.* 2014 May; 35(5): p. 4821-4830.
  151. Li X, Sun G, Meng J, et al. Role of toll-like receptor 4 in colorectal carcinogenesis: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014 Apr; 9(4): p. e93904.
  152. Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptor on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 2005 Jun; 65(12): p. 5009-5014.
  153. Awasthi S. Toll-like receptor-4 modulation for cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 2014 Jul; 5(1): p. 328.
  154. Nasseemuddin M, Iqbal A, Nasti T, et al. Cell mediated immune responses through TLR4 prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis in mice. *Int J Cancer.* 2012 Feb; 130(4): p. 765-774.
  155. Ahmed A, Wang J, Redmond H. Silencing of TLR4 increases tumor progression and lung metastasis in a murine model of breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013 Dec; Suppl(3): p. S389-S396.
  156. Chung Y, Kim D. Enhanced TLR4 Expression on Colon Cancer Cells After Chemotherapy Promotes Cell Survival and Epithelial-Mesenchymal Transition Through Phosphorylation of GSK3 $\beta$ . *Anticancer Res.* 2016 Jul; 36(7): p. 3383-3394.
  157. Saavedra J, Zúñiga L, Vásquez J, et al. La matriz extracelular: un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. *Morfología.* 2015; 7(1).
  158. Kubben F, Sier C, Meijer M, et al. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer. *Br J Cancer.* 2006 Sep; 95(6): p. 744-751.