



Universidad de Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud. Investigación en
Cirugía y Traumatología.

TESIS DOCTORAL

“PAPEL DE LOS FIBROBLASTOS PERITUMORALES EN LA
PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE COLON HUMANO:
DESARROLLO DE UN MODELO ANIMAL”

Autor: María Ester Fernando Macías

Directores: Luis Barneo Serra

José Fernando Vázquez Villa

Oviedo, 2022



Universidad de Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud. Investigación en
Cirugía y Traumatología.

TESIS DOCTORAL

“PAPEL DE LOS FIBROBLASTOS PERITUMORALES EN LA
PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE COLON HUMANO:
DESARROLLO DE UN MODELO ANIMAL”

Autor: María Ester Fernando Macías

Directores: Luis Barneo Serra

José Fernando Vázquez Villa

Oviedo, 2022



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: PAPEL DE LOS FIBROBLASTOS PERITUMORALES EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE COLON HUMANO: DESARROLLO DE UN MODELO ANIMAL	Inglés: ROLE OF PERITUMORAL FIBROBLASTS IN HUMAN COLON CANCER PROGRESSION: DEVELOPMENT OF AN ANIMAL MODEL
2.- Autor	
Nombre: MARÍA ESTER FERNANDO MACÍAS	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon es la tercera neoplasia en cuanto a incidencia a nivel mundial. Se ha visto que el estroma peritumoral juega un papel importante en este tipo de cáncer. En este estudio centramos nuestra atención en los fibroblastos peritumorales (CAFs), y el ColX1 α 1, que es un marcador específico de estas células. El objetivo de esta tesis es analizar la influencia de los CAFs en el cáncer de colon y el desarrollo de un modelo de xenotrasplante de cáncer de colon humano en ratones inmunodeprimidos, asociado o no a fibroblastos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron fibroblastos normales (NF) y peritumorales de muestras quirúrgicas de cáncer de colon. Estas células se cultivaron *in vitro*, se analizó su capacidad de crecimiento local y se tiñeron con α -SMA, vimentina y proColX1 α 1. Utilizando ratones inmunodeprimidos SCID se realizaron xenotrasplantes heterotópicos en la cabeza del páncreas de células de cáncer de colon humano HT-29 asociados o no a fibroblastos normales o peritumorales.

Por otro lado estudiamos muestras de 189 pacientes afectados de cáncer de colon. La matriz extracelular se tiñó con tricrómico verde de Gomori y los CAFs con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-proColX1 α 1. Se obtuvieron datos del área teñida con proColX1 α 1, del área Gomori y del número de células proColX1 α 1 positivas. Las imágenes se analizaron con el programa Image J-FIJI que calcula el número de células y el área total de las zonas marcadas, y cuantifica también el número y el área de células no marcadas. Se realizó análisis estadístico por MedCalc v10 y SpSS v15.

RESULTADOS

Los CAF y NF cultivados fueron proColX1 α 1 + / VIM +, proColX1 α 1+ / alphaSMA + y proColX1 α 1 + / CK19 + en diferentes proporciones sin diferencias entre ellos, pero la curva de crecimiento de CAFs fue significativamente mayor que la del NF ($p < 0.05$). Se desarrollaron tumores de mayor tamaño en los animales que recibieron HT-29 asociado a CAFs.



En el estudio de muestras anatomopatológicas de cáncer de colon teñidas con Gomori y anti-proColX1 α 1, el número total de células del estroma, CAFs y su área fue mayor en estadios tumorales iniciales. El área de Gomori, en cambio, resultó ser menor en estadios iniciales y en casos sin recidiva.

CONCLUSIONES

- Es posible aislar y cultivar fibroblastos normales y peritumorales a partir de muestras de cáncer de colon humano.
- En el modelo de xenotrasplante, la asociación de fibroblastos peritumorales humanos genera, de forma precoz, tumores más grandes con metástasis hepáticas y pulmonares, que si se trasplantan sólo células de cáncer de colon.
- En el cáncer de colon, la presencia de mayor volumen de estroma en el tumor se relaciona con estadios avanzados.

RESUMEN (en Inglés)

INTRODUCTION

Colon cancer is the third neoplasm in terms of incidence worldwide. The peritumoral stroma has been seen to play an important role in this type of cancer. In this study we focus our attention on peritumoral fibroblasts (CAFs), and ColX1 α 1, which is a specific marker for these cells. The objective of this thesis is to analyze the influence of CAFs in colon cancer and the development of a xenotransplantation model of human colon cancer in immunosuppressed mice, associated or not with fibroblasts.

MATERIAL AND METHODS

Normal fibroblasts (NF) and peritumoral fibroblasts were obtained from colon cancer surgical specimens. These cells were cultured *in vitro*, their local growth capacity was analyzed and they were stained with α -SMA, vimentin and proColX1 α 1. Using immunosuppressed SCID mice, heterotopic xenografts were performed in the head of the pancreas of HT-29 human colon cancer cells, associated or not with normal or peritumoral fibroblasts.

On the other hand, we studied samples from 189 patients with colon cancer. The extracellular matrix was stained with Gomori green trichrome and the CAFs with the anti-proColX1 α 1 mouse monoclonal antibody. Data were obtained on the proColX1 α 1 stained area, the Gomori area and the number of proColX1 α 1 positive cells. The images were analyzed with Image J-FIJI which measures the number of cells and the total area of the marked regions, and also quantifies the number and the area of unlabeled cells. Statistical analysis was performed by MedCalc v10 and SpSS v15.

RESULTS

The cultured CAFs and NF were proColX1 α 1 + / VIM +, proColX1 α 1 + / alphaSMA + and proColX1 α 1 + / CK19 + in different proportions without differences between them, but the growth



curve of CAFs was significantly higher than that of NF ($p < 0.05$).

Larger tumors were developed in animals that received HT-29 associated with CAFs. In the studies of anatomopathological samples of colon cancer stained with Gomori and anti-proColX α 1, the total number of stromal cells, CAFs and their area was higher in initial tumor stages. The Gomori area, on the other hand, turned out to be smaller in the initial stages and in cases without recurrence.

CONCLUSIONS

- Normal and peritumoral fibroblasts can be isolated and cultured from human colon cancer specimens.
- In the xenotransplantation model, the association of human peritumoral fibroblasts generates, earlier, larger tumors with liver and lung metastases, than if only colon cancer cells were transplanted.
- In colon cancer, the increased stroma volume in the tumor is associated with advanced stages.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____

“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos, y el horizonte se corre diez pasos más allá. Entonces, ¿para qué sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar”

Eduardo Galeano

A mis padres, que me han dado todo, y gracias a ellos soy quien soy.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, el doctor Luis Barneo Serra, el doctor Fernando Vázquez Villa y la doctora Carmen González del Rey Rodríguez que me han dado la oportunidad de realizar esta tesis. Gracias por su guía y su inmensa ayuda en este camino.

A todo el equipo que ha colaborado en la realización del trabajo de campo, análisis y elaboración de este trabajo.

A la Dra. Carmen García Pravia, por la extracción de las muestras quirúrgicas y su análisis anatomopatológico, junto con la Dra. González del Rey.

A María Teresa Fernández García, por el análisis de muestras de animales desde el IUOPA y su ayuda en todo lo necesario.

A Eva García Pérez, Laura Suárez Fernández, José A. Galván y Marcos García Ocaña por su trabajo en los cultivos celulares.

A Ángel Martínez Nistal y Marta Alonso Guervos, por su ayuda y su paciencia en los SCTs de la Universidad de Oviedo.

A mis compañeros Camilo López Arévalo, Paul Ugalde Serrano y Jimmy Jara Quezada, por la ayuda en los xenotrasplantes.

A mis compañeras y amigas Raquel Rodríguez Uría y Sandra Sanz Navarro, por el trabajo que han realizado y la ayuda y el apoyo en todo momento.

A Clara Barneo Caragol, por su gran ayuda en la elaboración de la tesis.

A Belén Porrero Guerrero, mi compañera y amiga, gracias a ella comencé en este estudio, que en parte también ha sido gracias a su trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	25
1.2. PATOGENIA.....	28
1.2.1. FACTORES AMBIENTALES.....	28
1.2.2. FACTORES GENÉTICOS.....	30
1.2.2.1. Aberraciones cromosómicas.....	31
1.2.2.2. Mutaciones génicas.....	32
1.2.2.3. Inestabilidad epigenética.....	34
1.3. ESTADIFICACIÓN – CLASIFICACIÓN.....	36
1.4. TRATAMIENTO.....	39
1.4.1 CIRUGÍA.....	39
1.4.2. QUIMIOTERAPIA.....	40
1.4.3. TERAPIAS CONTRA DIANAS ESPECÍFICAS	40
1.4.4. ESTADIO II.....	41
1.4.5. METÁSTASIS HEPÁTICAS SINCRÓNICAS	41
1.4.6. CARCINOMATOSIS PERITONEAL.....	41
1.5. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN ACTUALES.....	42
1.5.1. INFLAMACIÓN Y CÁNCER.....	42
1.5.2. FIBROBLASTOS Y ESTROMA.....	43
1.5.3. COLÁGENO XI α 1.....	50
1.5.4. TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA	53
1.5.5. SONIC HEDGEHOG.....	55
1.6. MODELOS DE CÁNCER DE COLON HUMANO.....	57
1.6.1. MODELOS DE CÁNCER ESPONTÁNEO EN ANIMALES.....	58
1.6.2. MODELOS EN RATONES CON MODIFICACIONES	

GENÉTICAS	58
1.6.2.1. Mutación APC.....	59
1.6.2.2. Mutaciones en los genes reparadores del DNA.....	59
1.6.2.3. Otros modelos.....	60
1.6.3. PROMOTORES EXÓGENOS.....	61
1.6.3.1. Dieta occidental.....	61
1.6.3.2. Inductores químicos.....	61
1.6.4. IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES.....	62
1.6.4.1. Enemas.....	62
1.6.4.2. Microinyección	63
1.6.4.3. Electrocoagulación transanal.....	63
1.6.4.4. Técnica quirúrgica	64
1.6.5. ORGANOIDES.....	67
2. JUSTIFICACIÓN	69
3. HIPÓTESIS.....	73
4. OBJETIVOS.....	77
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
5.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS QUIRÚRGICAS.....	83
5.2. CULTIVOS.....	84
5.2.1. CULTIVO DE FIBROBLASTOS.....	84
5.2.2. CULTIVO DE CÉLULAS HT-29.....	86
5.2.3. INMUNOFLUORESCENCIA DE CÉLULAS ESTROMALES CULTIVADAS Y MICROSCOPIA CONFOCAL.....	86
5.3. IDENTIFICACIÓN DE CAFs HUMANOS EN LOS XENOTRASPLANTES.....	87
5.4. XENOTRASPLANTE HETEROTÓPICO DE CÉLULAS HT-29 EN LA CABEZA DEL PÁNCREAS.....	88
5.4.1. RATONES.....	88
5.4.2. BIOTERIO.....	90

5.4.3. TRASPLANTES.....	91
5.4.3.1. Anestesia.....	91
5.4.3.2. Trasplante.....	92
5.4.3.3. Eutanasia.....	92
5.4.3.4. Análisis anatomopatológico	93
5.4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	94
5.5. CUANTIFICACIÓN DE ColXIα1 EN MUESTRAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO.....	95
5.5.1. RECOGIDA DE DATOS.....	95
5.5.2. MUESTRAS ANATOMOPATOLÓGICAS.....	96
5.5.3. OBTENCIÓN DE IMÁGENES.....	96
5.5.4. ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	101
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	102
5.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	102
6. RESULTADOS.....	103
6.1. CULTIVOS CELULARES.....	105
6.1.1. MORFOLOGÍA CELULAR.....	105
6.1.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO.....	110
6.2. IDENTIFICACIÓN DE CAFs HUMANOS EN LOS XENOTRASPLANTES.....	112
6.3. XENOTRASPLANTE HETEROTÓPICO DE CÉLULAS HT-29 EN LA CABEZA DEL PÁNCREAS.....	113
6.4. CUANTIFICACIÓN DE ColXIα1 EN MUESTRAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO.....	122
7. DISCUSIÓN.....	131
8. CONCLUSIONES.....	141
9. BIBLIOGRAFÍA.....	145
10. ANEXOS.....	169

ANEXO 1: PROTOCOLOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS QUIRÚGICAS PARA INVESTIGACIONES Y REALIZACIÓN DE XENOTRASPLANTES.....	171
ANEXO 2: PROTOCOLOS PARA CUANTIFICACIÓN DE ColXIα1 EN MUESTRAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO.....	176
ANEXO 3: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS.....	182
ANEXO 4: TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	187

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACM	Azoximetano
AJCC	Comité conjunto americano sobre el cáncer (American Joint Committee on Cancer)
APC	Adenomatous polyposis coli (gen supresor de tumores)
CAFs	Fibroblastos asociados a cáncer (Cancer-associated fibroblast) o fibroblastos peritumorales
CCHNP	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) o Síndrome de Lynch
CCL 2	Proteína quimioatrayente de monocitos (monocyte chemoattractant)
CCR	Cáncer colorrectal
COX2	Ciclooxigenasa 2
Dhh	Desert hedgehog
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DSS	Sodio sulfato de dextrano (Dextran sulfate sodium)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor)
EMT	Transición epitelio-mesénquima (Epithelial-mesenchymal transition)
FBS	Suero bovino fetal (fetal bovine serum)
FOLFOX	Oxaliplatino + ácido folínico + fluorouracilo
5FU	5-Fluoruracilo
5FU/LV	5 fluorouracilo + leucovorin
GEMM	Modelos de ratones modificados genéticamente (Genetically engineered)

mouse models)

GSK-3	Glicogenasa sintetasa kinasa 3
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte growth factor)
Hh	Gen hedgehog
HIPEC	Quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy)
ICQ	Inmunocitoquímica
Ihh	Indian hedgehog
IUOPA	Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias
KRAS	Oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten (Kirsten rat sarcoma viral oncogene)
lncRNAs	Ácidos ribonucleicos no codificantes largos (long non-coding ribonucleic acids)
MET	Transición mesénquima-epitelial (Mesenchymal-epithelial transition)
MIN	Neoplasia intestinal múltiple (Multiple intestinal neoplasia)
MMPs	Metaloproteinasas de matriz (Matrix metalloproteinases)
MMR	Genes reparadores de apareamientos de ADN incorrectos (Mismatch repair genes)
MYC	Oncogenes virales homólogos de mielocitomatosis (Myelocytomatosis viral oncogene homolog)
NF	Fibroblastos normales (Normal fibroblast)
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells)
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (Phosphate-buffered saline)
PDX	Xenoinjertos derivados del paciente (Patient derived xenograft)
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina
PTCH	Proteína transmembrana Patched (Patched transmembrane protein)
QT	Quimioterapia

RAS	Oncogén viral del sarcoma de rata (Rat sarcoma viral oncogene)
Shh	Sonic hedgehog
SMO	Proteína transmembrana Smoothened (Smoothened transmembrane protein)
TAM	Macrófagos asociados a tumor (Tumor associated macrophages)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β (Transforming growth factor β)
TKI	Inhibidores tirosina quinasa (Tyrosine kinase inhibitors)
TSR	Ratio estroma-tumor (Tumor-stroma ratio)
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor)
XELOX	Oxaliplatino y capecitabina

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) sigue siendo un problema en la actualidad, causando una mortalidad y morbilidad elevadas. A pesar de los avances en los tratamientos, un porcentaje no desdeñable de pacientes presenta metástasis o recidiva y fallece por esta causa.

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El CCR es el tercero más frecuente a nivel mundial, con 1,8 millones de casos estimados en 2018 (Figura 1). En cuanto a mortalidad por cáncer, se encuentra en segundo lugar, por detrás del pulmonar, con 880.792 fallecimientos en 2018 (1,2).

El cáncer de colon es tres veces más frecuente que el de recto (3) y el 97% de los tumores de colon son adenocarcinomas (4). Hay una gran variabilidad geográfica en cuanto a incidencia a nivel mundial, siendo estas diferencias similares en ambos sexos (1,5).

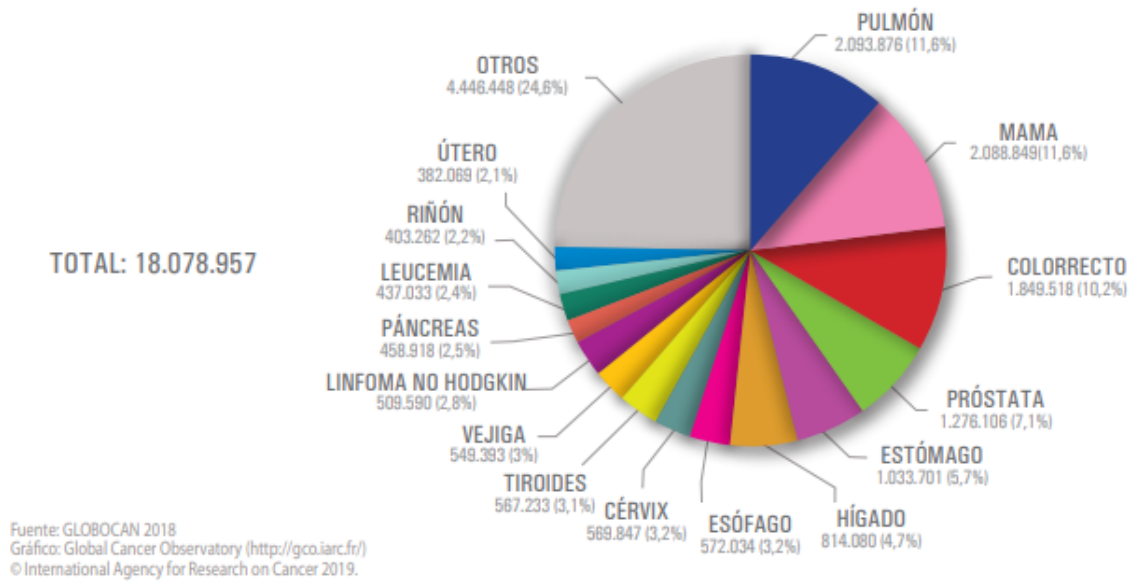


Figura 1. Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo. Estimación para el año 2018. Tomado de Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del Cáncer en España en 2020. [Internet]. SEOM. 2020 [actualizado 2019; citado 15 febrero 2020]. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf.) (5).

Las tasas más elevadas corresponden a los países industrializados (1,3). Se ha visto que los inmigrantes presentan las tasas de CCR predominantes en los países de adopción (6), por lo que estas variaciones se atribuyen a diferencias en la dieta y la exposición medioambiental, que se imponen sobre la susceptibilidad genética. El bajo nivel socioeconómico, muchas veces ligado al estilo de vida, también se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de CCR y especialmente de cáncer de recto según un estudio realizado en EE.UU. en 2012 (7). En cuanto a la mortalidad, es mayor en regiones menos desarrolladas, aunque la variabilidad es menor (1,8).

En nuestro país el CCR es el de mayor incidencia a nivel global, con una estimación de 44.231 casos diagnosticados en 2020, siendo el segundo en mujeres por detrás del cáncer de mama y el segundo en hombres por detrás del cáncer de próstata. La incidencia ha ido aumentando en los últimos años, probablemente debido a los cambios en el estilo de vida y la alimentación, así como por el aumento en la esperanza de vida. En cuanto a la prevalencia ocupó el tercer lugar en 2018, por detrás del cáncer de mama y el

de próstata (5).

Entre los tumores responsables del mayor número de fallecimientos en España, el CCR está en segundo lugar, con 11.265 muertes. Tanto en mujeres como en hombres se encuentra en segundo lugar en cuanto a mortalidad (5). La mortalidad ha disminuido progresivamente en los últimos años con el desarrollo de los tratamientos oncológicos y la mejora en las técnicas quirúrgicas, así como por el diagnóstico precoz con los programas de screening (5) .

En nuestro país, la supervivencia global a 5 años se encuentra en torno al 56% (5). La supervivencia de los tumores estadio C (presencia de afectación ganglionar) ha mejorado significativamente, consiguiendo aumentar la mediana a más de dos años. Así mismo, en algunos casos se consigue realizar un tratamiento quirúrgico óptimo del tumor primario o de las metástasis tras quimioterapia neoadyuvante (9).

Sin embargo, cerca del 50% de los pacientes presentan recurrencia de la enfermedad dentro de los primeros 5 años tras el tratamiento del tumor primario, siendo en la mayoría de los casos en forma de metástasis hepáticas (10,11). Las metástasis marcan el pronóstico del cáncer de colon. La supervivencia a 5 años de pacientes con metástasis a distancia es menor del 10%, con metástasis linfáticas del 50% y sin metástasis del 80% (9,12) (Tabla 1).

Estadio	Supervivencia a los 5 años
Estadio A	90 a 92%
Estadio B	50 a 75%
Estadio C	25 a 55%
Estadio D	Menos del 8%

Tabla 1. Supervivencia por estadios según clasificación de Dukes/Astler-Coller: **Estadio A:** lesión invade hasta la muscular propia, sin afectación ganglionar ni metástasis a distancia; **Estadio B:** sobrepasa la muscular propia, sin afectación ganglionar ni metástasis a distancia; **Estadio C:** afectación ganglionar; **Estadio D:** metástasis a distancia (9).

En Asturias el cáncer colorrectal representa el 16% de los tumores diagnosticados, siendo el segundo cáncer más frecuente entre los hombres, por detrás del de próstata, y entre las mujeres, tras el de mama, con algo más de 1.100 casos detectados al año (13).

1.2. PATOGENIA

El cáncer de colon y recto puede presentarse de forma hereditaria, esporádica o familiar. El 70% de los casos son esporádicos, pero se ha visto que en una cuarta parte de estos cánceres influyen factores familiares o hereditarios. Los casos familiares suponen el 25% y afectan a individuos con historia familiar de CCR. El riesgo se duplica en pacientes con un familiar de primer grado afecto y se triplica si hay antecedentes en dos o más. Además en estos casos los tumores suelen aparecer en pacientes más jóvenes. Las formas hereditarias representan el 5-10% y se caracterizan por su aparición en edades tempranas, la existencia de antecedentes familiares y la asociación con otros tipos de tumores (3,14).

1.2.1. FACTORES AMBIENTALES

La edad es uno de los factores más importantes. El riesgo de CCR aumenta después de la cuarta década de la vida y la mayoría de los tumores aparecen después de los 60 años. Sólo el 10% se diagnostican antes de los 40.

La dieta se ha aceptado como uno de los elementos principales en su desarrollo, debido a su contenido en mutágenos y carcinógenos (4,15–17), aunque esta relación es difícil de demostrar por estudios experimentales debido a los múltiples factores que influyen en su patogenia (6). Se ha visto que hay una asociación entre el aumento de ingesta de carne roja y el desarrollo de tumores, debido a la producción de nitrosaminas (4). El exceso de grasas también parece incrementar el riesgo.

Se cree que la disminución de antioxidantes y fibra podría favorecer la aparición

de esta enfermedad, aunque hay estudios que no encuentran reducción de la incidencia cuando se introducen suplementos de fibra en la dieta (18). También se ha asociado una disminución de los niveles de ácido fólico con aumento en la incidencia de estos tumores, ya que su déficit provoca alteraciones en la síntesis de ADN. A su vez se ha relacionado el cáncer de colon y recto con el consumo de alcohol, tabaco, obesidad y radioterapia previa. También con el efecto del contacto con la orina en casos de anastomosis uréterosigmoideas (6).

Algunos estudios sugieren que determinados alimentos podrían tener un efecto de quimioprevención del cáncer de colon, como por ejemplo los probióticos (15,19,20). Las bacterias residentes en el colon fermentan los probióticos, produciendo ácidos grasos de cadena corta, como acetato, propionato y butirato (21,22). Se ha descrito que el butirato está implicado en la prevención del CCR a distintos niveles, incluyendo la función de barrera intestinal, absorción mineral, diferenciación y crecimiento celular (22), e incluso se le atribuye una actividad inmunomoduladora a través de la inhibición del factor nuclear $\text{k}\beta$ (NF- $\text{k}\beta$) y su expresión en las células del tumor. Se observó una disminución de lesiones precancerosas en el colon de ratas que recibieron tratamiento con probióticos asociados a insulina, con una relación dosis dependiente de los primeros (15).

También hay evidencia epidemiológica que demuestra que un aumento del aporte de calcio previene la aparición de CCR. Esto se atribuye a su papel como quelante de las sales biliares (6).

Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal presentan un alto riesgo de desarrollar CCR, directamente relacionado con la duración y extensión de la enfermedad. En la colitis ulcerosa el riesgo parece comenzar a los 8-10 años del inicio de la enfermedad y aumenta cada año un 0.5-1%. Además tienen más probabilidades de desarrollar un tumor los pacientes con inicio temprano de la enfermedad, con pancolitis y con colangitis esclerosante asociada (3,4).

1.2.2. FACTORES GENÉTICOS

La transformación de un tejido en cáncer es un proceso muy complejo que incluye mutaciones en el material genético, aberraciones en los cromosomas, alteraciones epigenéticas, inestabilidad de los microsatélites y disfunción de las mitocondrias, entre las más importantes. Ninguna de estas alteraciones por sí solas tiene la exclusividad en la transformación maligna (23). Según la teoría propuesta por Fearon-Vogelstein, los carcinomas de colon invasivos derivan de pólipos adenomatosos, iniciándose con la mutación del gen supresor de tumores adenomatous polyposis coli (APC) (24,25) (Figura 2).

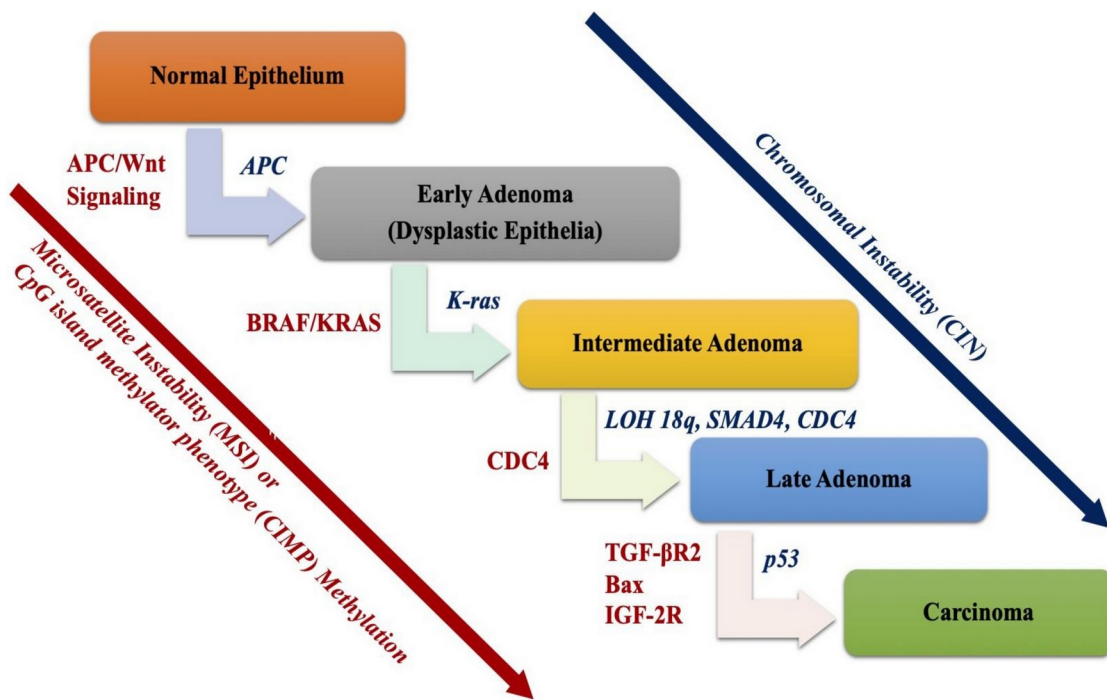


Figura 2. Modelo de alteraciones genéticas secuenciales que culminan en el cáncer de colon metastásico. Tomado de Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa A-E. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. Int J Mol Sci. 2020 Dec 24;22(1):130. doi: 10.3390/ijms22010130 (14).

En la teoría mutacional abanderada por Weinberg (26), el cáncer sería producido por alteraciones permanentes en la secuencia de bases del ADN codificante, sin embargo, tejidos normales también muestran una alta incidencia de mutaciones, y hay tumores sin mutaciones. Además, la velocidad de mutación fisiológica es muy lenta para explicar el origen del cáncer. Respecto a la inestabilidad cromosómica, produce alteraciones en la estructura del genoma, dando lugar a ganancias en el número de cromosomas (aneuploidia en el caso de un número impar de cromosomas) y a pérdidas totales o de fragmentos de cromosomas (delecciones). Estas alteraciones serían las causantes de las mutaciones en los protooncogenes y en los genes supresores (27) Pero no todas las células tumorales presentan aberraciones cromosómicas. Las disfunciones mitocondriales (28) son detectables en todos los tumores, sin embargo las mitocondropatías hereditarias no presentan una mayor incidencia de cáncer y se ha relacionado la mutación de algunos genes con el origen de la disfunción mitocondrial.

Podemos dividir estos procesos de alteraciones moleculares de la siguiente forma:

1.2.2.1. Aberraciones cromosómicas

Las aberraciones cromosómicas en el cáncer de colon resultan de errores en la replicación del ADN y división celular. Se producen ganancias y pérdidas de todo o de fragmentos de los cromosomas, con un desequilibrio en el número de cromosomas (aneuploidia), cambios en su estructura, mutaciones en los protooncogenes y genes supresores de tumores, amplificaciones genómicas y pérdida de la heterociguidad. Estas alteraciones pueden causar la activación de oncogenes (como KRAS y BRAF), inactivación de genes supresores (como APC y p53) y pérdida de heterociguidad (por ejemplo del cromosoma 18). La pérdida de heterociguidad es la ausencia de una de las dos copias de alelos en un gen, con el alelo restante frecuentemente afectado por una mutación. La pérdida de heterociguidad en la región 18q es la que se observa con más frecuencia en el CCR, asociándose a peor pronóstico (14).

1.2.2.2. Mutaciones génicas

Genes supresores

Los genes supresores regulan la actividad mitótica e inhiben el ciclo celular. Cuando se produce una mutación, esta regulación se pierde. Para que se inicie el desarrollo del tumor se precisa la alteración de ambos alelos (24,29). El CCR comienza con una pérdida de función de la vía APC en las células del epitelio, por medio de la vía de señalización Wnt (30,31).

El gen APC está situado en el cromosoma 5q21 y codifica una proteína que interacciona en la vía de señalización Wnt, que a su vez interviene en la regulación de β -catenina, axina y conductina (estas dos últimas son proteínas de señalización negativa de Wnt). La β -catenina es una proteína multifuncional, componente estructural de las uniones intercelulares de las células endoteliales y del citoesqueleto de la actina (24,29). Cuando Wnt se une y activa el receptor Frizzler, APC forma un complejo en el citoplasma que produce la fosforilación de β -catenina por GSK-3 (glicogenasa sintetasa kinasa 3), lo que produce su degradación proteolítica (30,32).

Cuando se produce una mutación en APC, aumenta la β -catenina y se activa Wnt, lo que provoca la activación de la ciclina D1 y MYC (24,29). Estos cambios afectan a la transición de G1 a S en el ciclo celular, causando alteraciones en el crecimiento, lo que favorece la formación de pólipos (30).

En una fase tardía de la secuencia adenoma-carcinoma se producen mutaciones en p53. Este gen se sitúa en el brazo corto del cromosoma 17. En condiciones normales induce la apoptosis en respuesta al daño celular, facilitando los mecanismos reparadores del ADN. El 75% de los pacientes con cáncer de colon y recto presentan mutaciones en este gen (24,29).

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) es una enfermedad autosómica dominante que presenta una mutación en el gen germinal APC. El 1% de los CCR son debidos a esta alteración (3,4). Dependiendo del lugar donde aparezcan las mutaciones, la enfermedad presenta distintas expresiones clínicas (severa o atenuada) y se asocia o no a manifestaciones extracolónicas. Se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos en todo el colon y recto, pudiendo aparecer tumores en otras localizaciones (tumores

desmoides abdominales, adenomas/carcinomas duodenales, adenomas gástricos, osteomas mandibulares...) (4). Prácticamente el 100% de los pacientes con PAF desarrolla CCR en la 4ª o 5ª década de la vida si no se tratan (3).

Genes reparadores

Los genes mismatch repair (MMR) se encargan de corregir los errores en la replicación del ADN. Algunos de estos genes son *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *PMS1*, *PMS2* y *MSH6*. La mutación de estos genes induce el síndrome de cáncer hereditario de colon y recto sin poliposis (CCHNP). Estas mutaciones producen inestabilidad de microsatélites (24,29). Los microsatélites son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de forma consecutiva. La inestabilidad de microsatélites consiste en errores en la replicación debido a deleciones o inserciones de nucleótidos, aparece en el 15% de los tumores esporádicos y en el 95% de los CCHNP (4). Se ha visto que los casos con alta tasa de inestabilidad de microsatélites tienen mejor pronóstico (33).

El CCHNP o Síndrome de Lynch es una enfermedad autosómica dominante (4) que causa el 5-6% de los cánceres colorrectales (3). Estos pacientes tienen una incidencia del 80% de CCR, que suele aparecer a una edad temprana (alrededor de los 45 años), con predominio de afectación del colon derecho y de aparición de tumores sincrónicos y metacrónicos. Hay dos variantes, el síndrome de Lynch tipo I, donde sólo aumenta la incidencia de CCR; y el tipo II, que se asocia además a tumores en otras localizaciones como ovario, útero, estómago, páncreas, intestino delgado, tracto urinario, hígado y vías biliares y cerebro (3,4).

Oncogenes

Los oncogenes se producen a través de la mutación de genes encargados de fomentar el crecimiento y proliferación celular descontrolada, a través de un aumento de los factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento (erb B2) y transductores de señal (RAS, SRC, ABL), facilitando así la producción de neoplasias.

La mutación del protooncogen RAS (cromosoma 12) se produce de manera

temprana en la secuencia adenoma-carcinoma. Esto ocurre en el 50% de los tumores de colon, provocando una proliferación celular continuada, incluso en ausencia de los factores de crecimiento que precisa RAS para actuar en condiciones normales (24,29).

lncRNAs

Los ARNs no codificantes largos (lncRNAs) son aquellos transcritos que presentan al menos 200 nucleótidos de longitud y que no codifican proteínas. En los últimos años se ha dado importancia a estos ARNs ya que se ha visto que pueden desempeñar diversas funciones en la expresión de genes. Existen diversos estudios que afirman que los lncRNAs están implicados en el desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer, entre ellos el CCR. Juegan un papel en la carcinogénesis modulando la expresión genética al alterar la estructura espacial de la cromatina, interactuando entre promotores e intensificadores o modificando las histonas por metilación. Se ha visto que intervienen en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis, la capacidad de migración e invasión tumoral, la transición epitelio-mesénquima (EMT), las células madre tumorales y la resistencia a quimioterápicos (34,35).

1.2.2.3. Inestabilidad epigenética

Las modificaciones epigenéticas son reordenamientos de la cromatina que modulan la expresión de genes sin cambiar la secuencia de ADN. En la carcinogénesis se producen cambios epigenéticos en el ADN, produciendo modificaciones en la expresión de los genes. Hay alteraciones de los patrones de metilación del ADN, modificación de las histonas y reubicación de los nucleosomas. El proceso epigenético puede causar mutaciones puntuales de los genes y desactivar los mecanismos de reparación del ADN. Las histonas, proteínas de embalaje de ADN, están sujetas a un gran número de modificaciones como acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, etc. que desempeñan un papel en la expresión génica.

Metilación del ADN

La metilación del ADN es la adición de un grupo metilo a la citosina a través de un enlace covalente dentro de un dinucleótido CG (14). Este proceso es mediado por las enzimas denominadas ADN metiltransferasas que están altamente expresadas en el cáncer. La metilación del ADN en las islas CpG, que son regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos, silencia la expresión génica al interferir con maquinaria transcripcional. Esta metilación en los sitios CG de las regiones promotoras de los genes supresores de tumores, los silencia. Estas alteraciones pueden interferir en la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular, ya que los reguladores del ciclo celular, tales como p16, p21, p27, y p53, son silenciados por la metilación en muchos cánceres. La hipermetilación dentro de la región promotora puede conducir a la inactivación de genes supresores de tumores, mientras que la hipometilación global se asocia con inestabilidad genómica y aberraciones cromosómicas. Las alteraciones en el patrón de metilación pueden afectar prácticamente a todas las vías de señalización, que incluyen TP53, TGF- β / SMAD, Wnt, NOTCH y receptor de tirosina quinasas implicadas en la regulación del ciclo celular, regulación de la transcripción, estabilidad del ADN, apoptosis, adhesión célula-célula, angiogénesis, invasión celular y metástasis (14).

En el cáncer hay un número de genes con hipermetilación aberrante que se asocian con la recurrencia de la enfermedad. La hipermetilación aberrante inactiva los genes relacionados con el control del ciclo celular, apoptosis y la reparación del ADN. Por otro lado, la hipometilación global también ha sido implicada en el desarrollo y progresión del cáncer a través de diferentes mecanismos. Típicamente, hay hipermetilación de genes supresores de tumores e hipometilación de oncogenes.

1.3. ESTADIFICACIÓN – CLASIFICACIÓN

En este apartado sólo haremos referencia al tratamiento en el cáncer de colon ya que el recto no es objeto de nuestro estudio.

En el tratamiento del cáncer de colon, siempre que sea posible, la primera opción es la cirugía, que consiste en reseca el tumor y los ganglios linfáticos regionales. Su análisis anatomopatológico, junto con los estudios preoperatorios, nos permite estadiar la enfermedad según el sistema TNM del AJCC (American Joint Committee on Cancer) (9,36) (Tablas 2 y 3).

<p><u>Tumor primario (T)</u></p> <p>Tx No puede evaluarse el tumor primario</p> <p>T0 No hay evidencia de tumor primario</p> <p>Tis Carcinoma in situ o invasión de la lámina propia sin extensión a la submucosa a través de la muscularis mucosae</p> <p>T1 Tumor invade la submucosa</p> <p>T2 Tumor invade la muscular propia</p> <p>T3 Tumor invade la subserosa o los tejidos pericólicos no peritonealizados o los tejidos perirrectales</p> <p>T4 Tumor que invade directamente órganos o estructuras y/o perfora el peritoneo visceral</p>	<p><u>Afectación ganglionar (N)</u></p> <p>Nx No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales</p> <p>N0 No se demuestran metástasis ganglionares regionales</p> <p>N1 Afectación de 1 a 3 ganglios linfáticos regionales</p> <p>N2 Afectación de 4 o más ganglios linfáticos regionales</p>
	<p><u>Metástasis a distancia (M)</u></p> <p>Mx No puede evaluarse la presencia de metástasis a distancia</p> <p>M0 No hay metástasis a distancia</p> <p>M1 Presencia de metástasis a distancia</p>

Tabla 2. Clasificación TNM del AJCC del CCR.

ESTADIO	T	N	M	DUKES	ASTLER-COLLER MODIFICADA
0	Tis	N0	M0		
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1	M0	C	C1
IIIB	T3-T4	N1	M0	C	C2
IIIC	Cualquier T	N2	M0	C	C3
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	D	D

Tabla 3. Estadios según la clasificación TNM del AJCC para el CCR (24).

Otros factores del estudio anatomopatológico que se relacionan con el pronóstico son el grado de diferenciación (Tabla 4) y la invasión linfovascular, que se asocian a mayor probabilidad de metástasis a distancia (3).

Grado histológico (G)
GX No se puede evaluar el grado
G1 Bien diferenciado
G2 Moderadamente diferenciado
G3 Poco diferenciado
G4 Indiferenciado

Tabla 4. Clasificación del grado histológico del CCR.

Aparte del TNM, se han propuesto otros marcadores pronósticos como la morfología celular, mutaciones genéticas y respuesta inmune, para intentar clasificar mejor cada tumor (37). Los marcadores genéticos moleculares podrían contribuir a la

identificación de pacientes de alto o bajo riesgo para administrar un tratamiento más individualizado (3). Se ha propuesto recientemente una clasificación del CCR basada en datos genómicos, a partir de un estudio multicéntrico de 4.000 pacientes (Consensus Molecular Subtypes, CMS), estableciéndose 4 subtipos:

- CMS1 (inestabilidad microsatélite inmune): 15% de los tumores. Es un subtipo que se caracteriza por una potente activación inmunológica. Los pacientes afectados por este grupo son los que más beneficio obtendrían con la inmunoterapia.
- CMS2 (epitelial canónico): 40% de los tumores. Es el grupo con mayor inestabilidad cromosómica, el que sigue la carcinogénesis clásica del CCR con activación de las rutas Wnt, MYC y EGFR.
- CMS3 (epitelial metabólico): 15% de los tumores. Se caracteriza por tener desregulación de las vías metabólicas asociadas a mutaciones del gen KRAS.
- CMS4 (mesenquimal): 30% de los tumores. Presenta un pronóstico muy desfavorable con el tratamiento estándar del CCR a causa de una activación de las vías de TGF- β , angiogénesis e invasión estromal.

En la actualidad, se continúan realizando ensayos clínicos para valorar la aplicabilidad clínica de esta clasificación molecular (38).

1.4. TRATAMIENTO

El sistema TNM es el más utilizado, valora la infiltración tumoral, la afectación ganglionar y las metástasis a distancia, y proporciona información sobre el pronóstico, lo que nos permite seleccionar el tratamiento más indicado (36,37) (Tabla 5).

ESTADIO TNM	TRATAMIENTO
Estadio I	Cirugía
Estadio II	Cirugía
Estadio III	Cirugía + QT adyuvante
Estadio IV	Cirugía
	QT neoadyuvante
	QT adyuvante
	QT

Tabla 5. Tratamiento recomendado según el estadio del CCR (39)

1.4.1 CIRUGÍA

El objetivo principal de la cirugía es la extirpación del segmento colorrectal donde se encuentra el tumor con márgenes suficientes, así como los pedículos vasculares y el sistema linfático de dicho segmento. Hay estudios que indican que la resección de 12 ganglios linfáticos o más facilita la correcta estadificación y mejora el pronóstico. La biopsia del ganglio centinela en tumores de colon aún no se ha establecido como una práctica rutinaria, ya que los resultados obtenidos por el momento son discordantes.

1.4.2. QUIMIOTERAPIA

Actualmente existen varios quimioterápicos que se utilizan frente al CCR, entre los que destacan el 5-Fluoruracilo (5FU), las fluoropirimidinas orales (capecitabina, UFT, Utefos), el oxaliplatino y el irinotecan. La quimioterapia adyuvante está indicada en pacientes con tumores estadio III o IV. Se utilizan distintos esquemas según la actividad antitumoral, la tolerancia y las características del paciente (voluntad, estado general, comorbilidades...). El esquema FOLFOX (oxaliplatino + ácido folínico + fluorouracilo) o XELOX (oxaliplatino y capecitabina) durante 6 meses es el tratamiento estándar. Los esquemas 5FU/LV (5 fluorouracilo + leucovorin) y capecitabina también han demostrado beneficio, y se utilizan en pacientes donde no se puede administrar oxaliplatino (40).

1.4.3. TERAPIAS CONTRA DIANAS ESPECÍFICAS

Los fármacos biológicos actúan sobre un factor de crecimiento o sus receptores. En el CCR se utilizan el cetuximab y panitumumab, que son anticuerpos monoclonales contra el factor de crecimiento epidérmico (EGFR); el bevacizumab, que es un anticuerpo contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); y el aflibercept, una proteína de fusión recombinante que actúa contra VEGF y el factor de crecimiento placentario (41).

La asociación de estos tratamientos en los casos indicados han demostrado un aumento en la efectividad de la quimioterapia y la supervivencia (4).

También se utilizan inhibidores tirosina quinasa (TKI). De ellos, el regorafenib es útil para el CCR metastático refractario a terapias estándares (41).

1.4.4. ESTADIO II

Hay controversia en cuanto al tratamiento de los tumores estadio II. Alrededor del 10-25% de estos pacientes desarrollarán metástasis a distancia tras una resección curativa dentro de los primeros 5 años (42,43). Hay estudios que afirman que la recurrencia a 5 años es del 5-25% y que los pacientes con estadio IIB tienen peor pronóstico que los de estadio IIIA (37). La quimioterapia adyuvante en este estadio no es un tratamiento recomendado, ya que el aumento de la supervivencia a los 5 años es menor del 5% (33,42,44,45). En los tumores de alto riesgo (T4, perforación, obstrucción, alto grado histológico, número de ganglios insuficiente), se podría recomendar la quimioterapia adyuvante por la mayor frecuencia de recidiva de la enfermedad en estos casos (40,42,43). Sin embargo, la decisión de utilizarla en estos pacientes es complicada y en la mayoría no se indica. Por tanto, sería necesario identificar claramente los tumores con alto riesgo de diseminación para optimizar el uso de las terapias adyuvantes (42).

1.4.5. METÁSTASIS HEPÁTICAS SINCRÓNICAS

El 20% de los pacientes con CCR presentan metástasis hepáticas al diagnóstico. No está clara la necesidad de cirugía sobre el tumor primario cuando éste no produce clínica y las metástasis son irresecables.

Cuando tanto el primario como las metástasis son resecables, hay varios esquemas de tratamiento pero no está claro cuál supone mayor beneficio, por lo que cada caso debe individualizarse (40).

1.4.6. CARCINOMATOSIS PERITONEAL

Aproximadamente el 13% de los casos de CCR presenta carcinomatosis peritoneal. Esto implica una supervivencia muy baja, de 6-7 meses. Normalmente estos

enfermos reciben quimioterapia sistémica, reservando la cirugía para las complicaciones. Varios grupos han comenzado a realizar cirugía citorreductora asociada a quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (HIPEC). Este es un tratamiento muy agresivo, con alta tasa de morbilidad y mortalidad, pero mejora significativamente la supervivencia en estos pacientes (3).

1.5. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN ACTUALES

1.5.1. INFLAMACIÓN Y CÁNCER

La inflamación es un proceso fisiológico que aparece como respuesta del organismo ante agentes lesivos, bien sean infecciones, sustancias químicas o traumas, que alteran la homeostasis y producen daño celular (46). Cuando el proceso se hace crónico, se pueden generar cambios en el ADN celular, que podrían iniciar el proceso neoplásico (47,48).

La relación entre inflamación y cáncer ha despertado interés desde que Rudolf Virchow observó que distintos tipos de cáncer aparecían en tejidos con inflamación crónica (48,49). Este interés ha aumentado en los últimos años gracias a múltiples estudios que han demostrado que las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino aumentan el riesgo de cáncer de colon (50–53).

Aún hay controversias en cuanto a la relación entre inflamación y neoplasia de colon. Por un lado, las células inflamatorias tienen una función de protección antitumoral. Hay estudios que indican que la reacción linfocítica es un factor pronóstico independiente para una mayor supervivencia (12,54,55). Se ha relacionado la infiltración tumoral por células inflamatorias con un aumento de la supervivencia (56). Parece que la presencia de infiltrado tumoral de linfocitos se asocia a un mejor pronóstico y a una disminución del potencial metastásico (57). En recto, se ha relacionado un mayor estadio de Dukes con menor infiltrado de linfocitos peritumorales (12,58). En un estudio de 2015, se observó que la ausencia de infiltrado inflamatorio intratumoral de linfocitos se asociaba con la existencia de metástasis ganglionares y a distancia. Todo esto parece indicar que la

inmunidad adquirida juega un papel fundamental en la prevención de la progresión tumoral (12).

Por otro lado, la respuesta inflamatoria puede promover la progresión tumoral por medio de citoquinas proinflamatorias que activan vías de señalización, aumentando el crecimiento y la supervivencia de las células neoplásicas (12,59). La inflamación asociada al cáncer puede influir en la proliferación y supervivencia celular, angiogénesis, migración de células tumorales, invasión y metástasis (48,60). Hay estudios que indican que las células inmunes presentes en mayor cantidad en el infiltrado peritumoral son los macrófagos y los mastocitos. Estos macrófagos asociados a tumor (TAM) podrían suprimir la respuesta inmune antitumoral por medio de la IL-10 y la PGE2 y facilitar el crecimiento tumoral secretando factores angiogénicos como el VEGF, endotelina-2 y el factor de activación del plasminógeno (48,61–65). Los mastocitos intervienen en la angiogénesis y se localizan fundamentalmente alrededor de los vasos (48). Un ejemplo de que la inflamación crónica contribuye al desarrollo tumoral es el cáncer de colon asociado a la colitis que ocurre en la enfermedad inflamatoria intestinal. En pacientes con colitis ulcerosa de larga evolución, con inflamación extensa y severa, aumenta el riesgo de cáncer de colon (60,66).

1.5.2. FIBROBLASTOS Y ESTROMA

El tejido conectivo está presente en todos los órganos y sistemas, se encarga de dar soporte a los epitelios, es el nexo de unión de los demás tejidos del organismo, es un medio para el intercambio de gases y nutrientes y es donde se producen las reacciones de defensa (inflamatoria e inmunitaria). Casi todo el tejido conectivo procede del mesodermo. Está formado por la matriz extracelular, amorfa y fibrilar; y células, entre las que predominan los fibroblastos (67) (Figura 3).

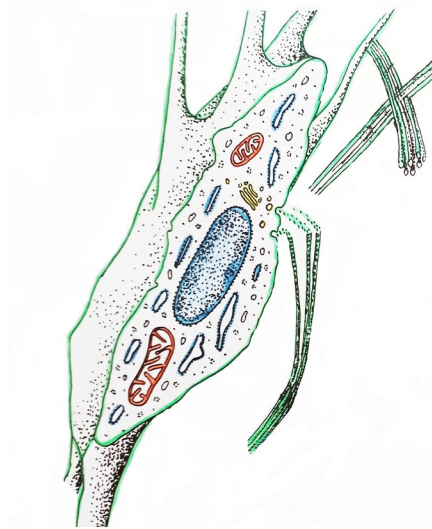


Figura 3. Fibroblasto. Modificado de Carrascal E. Láminas de Histología. Histología General. Salamanca: Librería Cervantes; 1997.

Los fibroblastos se describieron en el siglo XIX y constituyen el principal componente celular del tejido conectivo (66,68). Estas células proceden de las células mesenquimales y se denominan fibrocitos cuando se encuentran en estado de “reposo”. Son células fusiformes o estrelladas, con un núcleo alargado que contiene grupos de heterocromatina debajo de la membrana nuclear. En su estado activo contienen uno o dos nucléolos prominentes y un citoplasma rico en organelas (67).

Son responsables de la síntesis de matriz extracelular, regulan la diferenciación epitelial, la inflamación y están implicados en la cicatrización (66,68). Estas células sintetizan la mayoría de los constituyentes del componente fibrilar de la matriz extracelular, como colágeno tipo I, III, V y fibronectina. También contribuyen a la formación de membranas basales con la síntesis de colágeno tipo IV y laminina. Están implicados en la degradación de proteasas como las metaloproteinasas, lo que ayuda al mantenimiento de la matriz extracelular. Además secretan factores de crecimiento, contribuyendo así en la homeostasis del epitelio (68).

La síntesis de fibras colágenas consta de dos fases, una intracelular y otra extracelular. Comienza por la formación de procadenas alfa en el retículo endoplasmático

rugoso. Una vez sintetizadas se alinean de 3 en 3 mediante puentes disulfuro (-S-S) y se enrollan en una triple hélice constituyendo moléculas de procolágeno. Estas moléculas son empaquetadas en vesículas en el aparato de Golgi y excretadas al exterior. Por medio de peptidasas se liberan los terminales amino y carboxilo, dando lugar a moléculas de tropocolágeno. Estas moléculas forman enlaces entre sí, formando fibrillas de colágeno (67) (Figura 4).

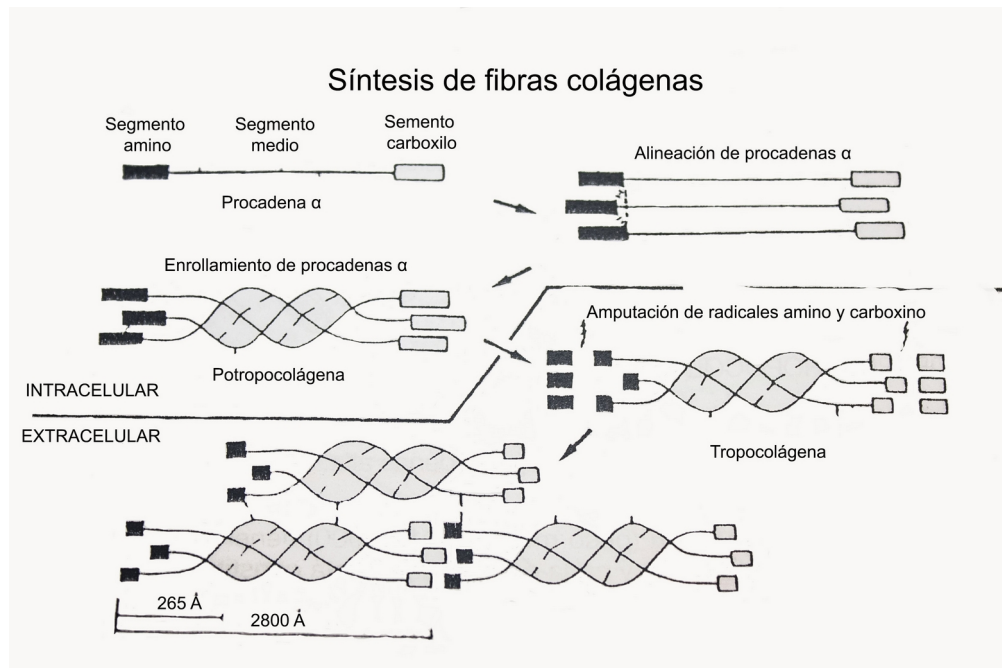


Figura 4. Síntesis de colágeno. Modificado de Carrascal E. Histología General. Salamanca: Librería Cervantes; 1997.

En cuanto a la cicatrización de heridas, los fibroblastos llegan a las lesiones y se activan, adquiriendo un fenotipo contráctil con aumento de expresión de α -actina del músculo liso (α -SMA), lo que conocemos como miofibroblastos (66,69). En su forma activada, producen más constituyentes de la matriz extracelular y presentan mayor proliferación que en tejidos sanos. La matriz extracelular sirve de soporte para otras células, contribuyendo a la cicatrización de las heridas y a la fibrosis tisular, estas células producen factores de crecimiento y citoquinas que regulan el proceso de cicatrización (66,70). Cuando la herida está reparada disminuye el número de fibroblastos activados, predominando de nuevo los fibrocitos. Se desconoce si los fibroblastos sufren apoptosis o

si vuelven a su estado inicial (68).

Los fibroblastos también tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer. Virchow estableció por primera vez la relación del estroma sobre el cáncer, encontrando niveles elevados de células inflamatorias e inmunoglobulinas en el tejido tumoral. A su vez Paget desarrolló la teoría de *seed and soil* (“semilla y suelo”) basándose en un estudio sobre autopsias de pacientes con distintos tumores. Observó que algunos tumores metastatizaban con más frecuencia en determinados órganos, lo que le llevó a la hipótesis de que tanto las células tumorales como el estroma tienen un papel en el desarrollo de metástasis a distancia (71).

Estudios genéticos y de biología celular apoyan la teoría de Paget de que el crecimiento tumoral no está determinado exclusivamente por las células tumorales, sino también por el estroma. Se ha investigado el papel de los fibroblastos “en reposo” y activados en el cáncer, observándose que los fibroblastos normales obtenidos de distintos tejidos humanos pueden inhibir la proliferación *in vitro* de células de líneas de varios tipos de cáncer (66,72). Además, los fibroblastos intestinales ayudan en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio, por lo que podrían intervenir en la prevención de la carcinogénesis en el tubo digestivo (66,73). Por lo tanto, en condiciones normales parece que estas células contribuyen a mantener la homeostasis del tejido epitelial y a prevenir el desarrollo de tumores (66,74).

Se piensa que una subpoblación de fibroblastos, los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), son promotores del crecimiento y progresión tumoral (68). Los CAFs son distintos a los fibroblastos del tejido normal, tanto en su estructura molecular como en su función sobre las células epiteliales vecinas. Al igual que en la cicatrización, los CAFs tienen un fenotipo similar a los miofibroblastos con expresión de α -SMA (66,74). Pero a diferencia de éstos, los fibroblastos adyacentes al tumor permanecen perpetuamente activados (66,75). En un estudio en el que se compararon fibroblastos normales y CAFs en CCR se encontraron diferencias en la expresión de 108 genes. Ya se había observado desregulación de estos genes en otros tipos de tumores, como mama, pulmón y esófago (76,77).

El análisis genético revela que los CAFs sobreexpresan genes asociados con el desarrollo y señales intercelulares. Los productos de estos genes pueden modular las funciones de las células tumorales para promover su invasión y metástasis (66,76). En

modelos animales de cáncer de próstata y mama, se ha visto que células epiteliales sanas pueden malignizarse cuando se rodean de fibroblastos procedentes de un carcinoma primario (66). En el cáncer de próstata, las células epiteliales premalignas se pueden transformar en células neoplásicas cuando se cultivan *in vitro* con CAFs derivados del cáncer de próstata humano (66,78). Las células epiteliales mamarias humanas trasplantadas en ratón inmunodeficiente junto con fibroblastos con sobreexpresión de TGF- β y/o factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) desarrollaron un tejido proliferativo similar a los tumores ductales humanos. Con estas observaciones algunos autores han interpretado que los CAFs pueden iniciar la transformación maligna de las células epiteliales secretando esos factores de crecimiento (66,79).

El estroma peritumoral crea un ambiente que mantiene las células madre tumorales. Estas células presentan la vía Wnt activada y una translocación nuclear de la oncoproteína β -catenina. Se ha visto que las células localizadas en el frente de invasión tumoral adquieren más características de células madre que las células de la parte central del tumor, debido a los fibroblastos del estroma que activan la vía Wnt (37). Los tumores con mayor número de células madre presentan peor pronóstico (37). Las características similares a células madre adquiridas por las células tumorales pre metastásicas están ligadas a la inducción de EMT (transición epitelio mesénquima). Se ha visto en varios estudios que el estroma peritumoral, en especial los miofibroblastos, pueden inducir EMT en células tumorales vía contacto célula a célula (37).

Los CAFs en el cáncer de colon secretan HGF, activando la transcripción dependiente de β -catenina por lo que inducen la formación de clones de células madre tumorales (66,80). Además, el HGF derivado de los CAFs restaura el fenotipo de células madres tumorales en tejidos tumorales más diferenciados, *in vivo* e *in vitro* (66,81).

Se ha visto que también expresan varias metaloproteinasas de matriz (MMPs) que causan una destrucción proteolítica de la membrana basal y ayudan a las células tumorales a invadir tejidos vecinos (66,82).

La inflamación, especialmente la crónica, se ha relacionado estrechamente con el origen de tumores en varios tipos de cáncer (66,83). Los CAFs, como los componentes celulares más abundantes en la inflamación relacionada con el cáncer, median esta inflamación a través de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (66,84). Esto aumenta la expresión de varias quimiocinas como la

proteína quimioatrayente de monocitos (CCL2) y genes proinflamatorios como ciclooxigenasa 2 (COX2) en CAFs. Las quimiocinas CCL2 median la reclutación de monocitos desde el torrente sanguíneo al tumor (92), favoreciendo la generación de macrófagos asociados a tumor con potente actividad tumorigénica. Simultáneamente, COX2 genera prostaglandina E2, lo que puede promover la proliferación de células epiteliales colónicas en situación normal o cáncer (66,86).

Como respuesta al estrés mecánico producido en los tejidos, los CAFs aumentan su contractilidad, lo que puede aumentar la producción de colágeno. En esta situación estas células sintetizan proteínas de matriz extracelular (66,87) que forman una barrera física que dificulta la penetración de los agentes quimioterápicos en los tumores sólidos (66,88,89). Esto aumenta la presión intersticial y la hipoxia en el tumor, por lo que éste responde aumentando los mecanismos de angiogénesis, migración y metabolismo (37). Además, las células tumorales adquieren quimiorresistencia a través de la activación de varias vías de señalización que favorecen la supervivencia celular, después de tener contacto con estas proteínas (66,88,89). También se ha visto que hay otros factores solubles derivados de los CAFs que están involucrados en la resistencia a drogas, como CXCL12 (66,90).

Comparando especímenes de CCR humano, se ha visto que en los tratados con quimioterapia hay un aumento significativo de los CAFs, que producen aumento de citoquinas como la IL17A, lo que aumenta la resistencia a este tratamiento y promueve la regeneración e invasión de las células tumorales (66,81). También pueden inducir la formación de neovascularización (66,82), que se produce sobre todo en el margen de invasión (66,91), mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un potente factor angiogénico (66,92). En presencia de células de cáncer de colon se aumenta la producción de interleuquinas por los CAFs, lo que a su vez incrementa la producción de VEGF (66,93). Se ha visto peor pronóstico en tumores con alto contenido de estroma tras tratamiento neoadyuvante (37).

Parece que los CAFs también están involucrados en la supresión de la inmunidad tumoral por mecanismos que no están del todo claros (66,94). Uno de estos mecanismos podría ser la expresión de TGF- β 1, que puede suprimir las funciones de varias células inmunes, particularmente de células T y células natural killer (66,95).

Por tanto, los CAFs pueden contribuir al desarrollo y progresión tumoral iniciando

la transformación maligna, aumentando la proliferación de las células madre e induciendo el fenotipo de célula madre tumoral. También parece que juegan un papel fundamental en el desarrollo de resistencia a quimioterápicos (66).

Berdiel-Acer y cols. llevaron a cabo un perfil genético de fibroblastos normales de colon, CAFs en tumor primario y CAFs en metástasis hepáticas. Identificaron 19 genes que pueden predecir con gran exactitud fibroblastos con potencial migratorio en pacientes con CCR. Estos 19 genes podrían identificar pacientes de bajo riesgo, lo que sería particularmente importante en estadio II, especialmente T4N0, que podrían beneficiarse de la omisión de tratamiento quimioterápico. El mismo grupo desarrolló una clasificación de 5 genes para predecir aumento de riesgo de muerte en pacientes estadio II/III (33).

Con estos datos se genera la hipótesis de que interrumpiendo las interacciones entre tumor y estroma se podría inhibir o disminuir la progresión tumoral y las metástasis. Se han obtenido beneficios en cuanto a supervivencia al administrar ácido acetil salicílico en pacientes con cáncer de colon y recto tras los tratamientos habituales (39,96,97). El estudio VICTOR, partiendo de esta hipótesis, estudió el tratamiento con rofecoxib (inhibidor de la COX2) comparado con placebo, sin obtener diferencias significativas. El estudio se suspendió antes de lo previsto por los efectos secundarios causados por este fármaco (33).

Se han realizado otros estudios con tratamientos sobre el estroma, con distintos resultados. Por ejemplo, sobre la vía del TGF- β , con resultados contradictorios (37). También se está investigando el tratamiento con imatinib, que actúa sobre la vía PDGFR, en pacientes con cáncer de colon CMS 4 (37). Se ha probado sibrotuzumab, un anticuerpo que inactiva FAP (marcador de CAFs), aunque no se ha demostrado su eficacia en cáncer de colon metastásico (37).

1.5.3. COLÁGENO XI α 1

El desarrollo de algunos tumores, especialmente los carcinomas, se asocia a la aparición de una importante reacción desmoplásica. Por este proceso se acumulan miofibroblastos activos, que sobreexpresan y secretan una gran variedad de colágenos (98). De los colágenos asociados a tumor, los fibrilares son los más importantes. Se secretan en forma de procolágeno, que está formado por un dominio triple hélice central que consta de 3 cadenas polipeptídicas (alfa 1,2 y 3) (99) formadas por repeticiones de tripletes Gly-x-y (100). Tras ser secretados sufren una escisión proteolítica y las moléculas de colágeno maduro se ensamblan en fragmentos extracelulares (98) (Figura 5).

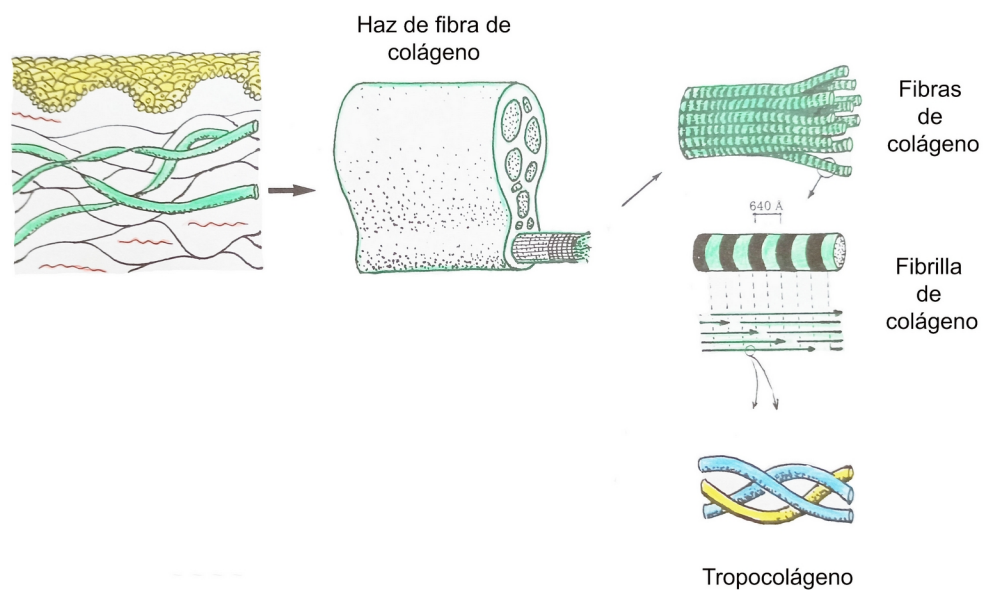


Figura 5. Estructura del colágeno. Modificado de Carrascal E. Láminas de Histología. Histología General. Salamanca: Librería Cervantes; 1997.

En los tejidos normales los colágenos I y II son los más abundantes, mientras que los V y XI son los más escasos. Estos últimos son codificados por los genes *COL5A1* y *COL11A1*, respectivamente. Son muy similares, compartiendo el 75% de su secuencia de aminoácidos (Figura 6) (99).

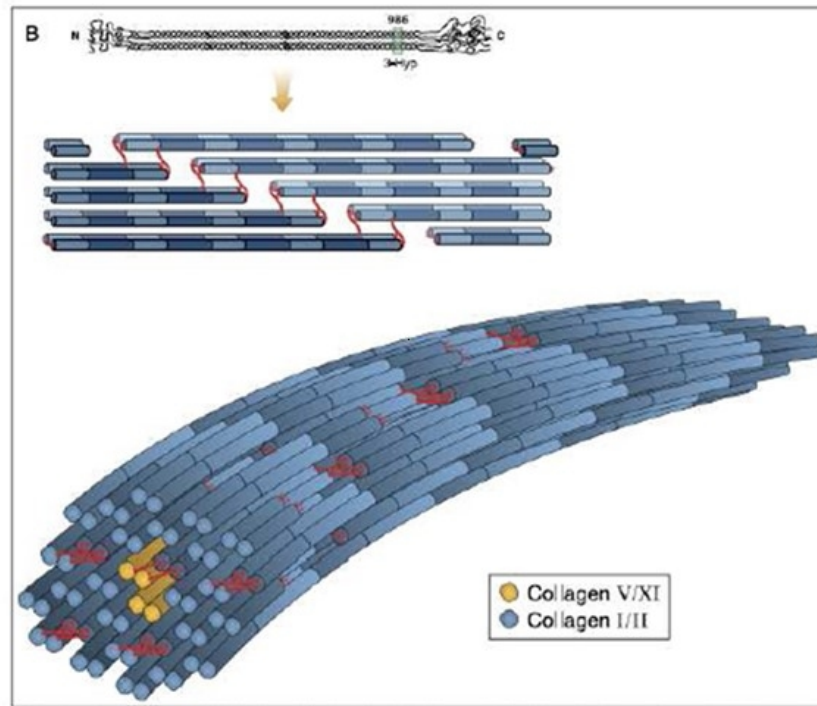


Figura 6: Estructura fibrilar del colágeno. Tomado de Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. 2004 Dec 17;279(51):53331-7.

Sin embargo, se ha visto que los colágenos V y XI están sobreexpresados en el estroma de algunos tumores humanos (98). Los ColXI α 1 y ColV α 1 se expresan en el cáncer colorrectal pero no en el tejido normal del colon ni en los adenomas. También parece que podrían tener un papel en el desarrollo del intestino, pero no se expresan en el tejido adulto, lo que demuestra que la carcinogénesis se asocia en algunos tumores con la expresión de un patrón embriológico en el estroma (100).

El gen *COL11A1* codifica la cadena alfa 1 de procolágeno y el colágeno maduro

tipo 11. Se ha visto que este colágeno aumenta en algunos tumores, en líneas celulares derivadas de tumores mesenquimales y en células madre mesenquimales y osteoblastos (101).

García-Ocaña y cols. (98) generaron y caracterizaron un anticuerpo monoclonal de ratón específico para el procolágeno XI α 1, que se denominó DMTX1/1E8.33. Utilizando este anticuerpo se ha demostrado la sobreexpresión de ColXI α 1 en los fibroblastos asociados a adenocarcinoma ductal del páncreas. Estas células expresaban también α -SMA y/o vimentina y/o desmina en distintas proporciones (98). Se ha visto que el procol11A1 aparece así mismo en las células estromales de adenocarcinoma de páncreas humano, observándose mayor número de células positivas y mayor área de células teñidas en estadios tumorales avanzados (101).

En otro estudio del grupo del Dr. Barneo realizado en 2014, se vio que el procolágeno XI α 1 se puede detectar por el anticuerpo monoclonal DMTX1/1E8.33 en células mesenquimales de la médula ósea y en células del estroma asociadas a adenocarcinoma de colon, pero no en el epitelio ni el estroma de colon normal. A diferencia de los hepatocarcinomas y los adenocarcinomas ductales de páncreas, en el adenocarcinoma de colon no se observa una cantidad significativa de células estrelladas desmina positiva. Se asoció la expresión de ColXI α 1 con estadios de Dukes avanzados, ganglios positivos y metástasis a distancia (101).

Se ha constatado que la expresión de ColXI α 1/ proColXI α 1 está casi ausente en procesos inflamatorios benignos como pancreatitis crónica, diverticulitis y adenosis mamaria, y es muy escasa en pólipos adenomatosos en la poliposis familiar. Por lo tanto, la sobreexpresión del gen de ColXI α 1 se podría considerar como un biomarcador de células estromales asociadas a cáncer. En este estudio se ha observado una asociación entre el aumento de las regiones marcadas con inmunotinción de proColXI α 1 y variables clinicopatológicas de mal pronóstico como presencia de metástasis ganglionares y a distancia y estadio de Dukes avanzado. Estos resultados concuerdan con el papel atribuido al ColXI α 1 de promover la agresividad y progresión tumoral (101). Sin embargo, en otro trabajo en el que se estudió la expresión de ColXI α 1 y ColIII α 1, no se encontró relación entre los niveles de estos colágenos y la recurrencia tumoral (76).

1.5.4. TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA

La EMT es un proceso por el que las células epiteliales se diferencian en células mesenquimales móviles. Es fundamental en el desarrollo, la cicatrización de heridas y el comportamiento de las células madre, y contribuye a la fibrosis y la progresión del cáncer (Figura 7). La transición mesénquima epitelial (MET) es el proceso inverso (102,103).

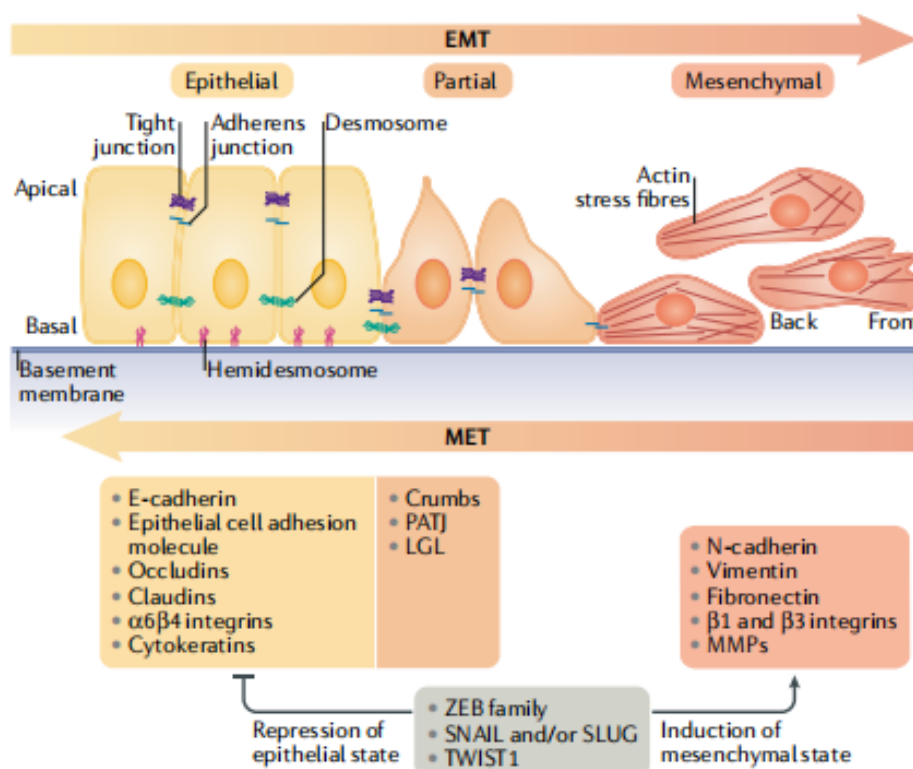


Figura 7. Esquema de la EMT y del proceso reverso (MET). Estos procesos son graduales, presentando estados intermedios hasta que se adquiere el nuevo fenotipo celular Tomado de Dongre, A. Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019;20:69–84.

Se puede considerar que hay tres tipos de EMT:

1. Transición de células epiteliales primitivas a células mesenquimales móviles, como parte de la gastrulación y generación de células migratorias de la cresta neural a partir de células primitivas neuroepiteliales. Estas células se transforman nuevamente en células epiteliales (MET).
2. Transición de células epiteliales o endoteliales a fibroblastos. En tejidos maduros, estos fibroblastos aparecen en respuesta a inflamación persistente.
3. Capacidad de movilidad de las células de un carcinoma para producir metástasis (104).

Durante la EMT, las células epiteliales pierden las uniones celulares formadas por proteínas como la E-cadherina, catenina y actina. Así mismo, pierden la polaridad ápico-basal, reorganizan su citoesqueleto y se someten a un cambio en los programas de señalización que definen la forma celular y reprograman la expresión génica. En muchos casos adquieren también la habilidad de degradar las proteínas de la matriz extracelular y resistencia al envejecimiento y la apoptosis. Esto aumenta la motilidad de las células individuales y permite el desarrollo de un fenotipo invasivo.

Varias vías oncogénicas pueden inducir ETM mediante la activación de factores de transcripción como SNAIL 1 y 2, TWIST y ZEB 1 y 2, que son claves de la regulación de EMT (103).

Se ha visto que el gen sonic hedgehog, entre otros, está implicado en este proceso. En la señalización HH, al unirse el receptor al ligando de Patched, activa los factores de transcripción de la familia GLI. GLI1 puede inducir la expresión de SNAIL1 lo que provoca una disminución de los niveles de E-cadherina en el epitelio, facilitando la EMT (102).

Los sistemas de clasificación basados en la expresión de genes han identificado un subtipo agresivo de cáncer de colon con características mesenquimales que podrían reflejar EMT de las células tumorales. Las células tumorales de este tipo de tumor expresan marcadores específicos de EMT, incluyendo ZEB 2, TWIST 2. Además, el colágeno tipo I predomina en la matriz extracelular imitando el medioambiente tumoral. En un estudio se vio que el colágeno tipo I puede inducir las células de CCR a expresar genes específicos mesenquimales y a suprimir la expresión génica del factor nuclear del hepatocito 4, que activa la diferenciación epitelial. Por lo tanto, el colágeno tipo I

derivado de CAFs puede inducir ETM en las células tumorales promoviendo su invasión (66).

1.5.5. SONIC HEDGEHOG

El gen hedgehog (Hh) de *Drosophila melanogaster* fue identificado en 1980 (105) y clonado por primera vez en 1992.

Se denominó hedgehog por el fenotipo de la larva con el gen mutado, que aparece cubierta por dentículos puntiagudos que recuerdan a un erizo. Los mamíferos presentan tres genes de la familia Hedgehog que reciben el nombre de: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh) (106). Dhh e Ihh tomaron su nombre de especies de erizo y Shh fue nombrado así en honor al personaje de videojuegos de Sega. Este último es el homólogo de hedgehog más importante en vertebrados, participando principalmente en el desarrollo embrionario.

El gen *SHH* humano está localizado en el brazo largo del cromosoma 7, en posición 7q36 (107). Sintetiza una proteína en forma de precursor que precisa para hacerse activo un proceso de hidrólisis y la unión covalente de una molécula de colesterol y otra de ácido palmítico. Las proteínas Hh son las únicas que se modifican mediante enlace covalente con colesterol. La mutación de los enzimas que sintetizan el colesterol puede causar síndromes con fenotipo de falta de función de *SHH*. Así mismo, los fármacos que interfieren con la síntesis del colesterol tienen efecto teratógeno por este mismo mecanismo.

El receptor de la proteína Hh está constituido por dos proteínas transmembrana, Patched (PTCH) y Smoothed (SMO). PTCH tiene 12 dominios transmembrana y actúa como regulador negativo de SMO. Cuando Hh se une a PTCH, se produce un mecanismo de endocitosis del complejo formado (106) y la liberación de SMO, que propaga una señal intracelular activando la vía. SMO tiene 7 hélices alfa transmembrana y no está acoplado a proteína G (29). Como consecuencia se produce la activación de los factores de transcripción GLI: los activadores Gli 1 y Gli2 y el supresor Gli 3. Gli activado se acumula en el núcleo y controla la transcripción de los genes diana de hedgehog.

La activación de la vía Hh supone un incremento de la expresión de la proteína SNAIL y una disminución de la E-cadherina y las uniones estrechas intercelulares. También provoca un aumento de los factores angiogénicos, ciclinas (ciclinas D1 y B1), genes antiapoptóticos y una disminución de los genes apoptóticos (108).

Las proteínas de la familia hedgehog son factores paracrinos con actividades morfogénicas. En el embrión inducen la diferenciación celular a través de un gradiente de concentración determinado. Shh también desempeña funciones en el mantenimiento y regulación de las células madre en algunos órganos maduros (106).

Esta vía se ha implicado también en el desarrollo y progresión de algunos cánceres humanos, como el carcinoma pulmonar de células pequeñas, los carcinomas basocelulares, los meduloblastomas y los tumores del tracto digestivo. La mutación de PTCH aumenta la actividad de la vía, lo que ocurre en algunos síndromes humanos causando alteraciones del desarrollo y generación de tumores. Un defecto en la señalización de Hh se asocia con gran variedad de tumores digestivos. En la mayoría de adenocarcinomas ductales de páncreas aparece una activación de esta vía (106,109).

Se ha visto que la unión Hh-Gli es fundamental en la proliferación de los adenocarcinomas de colon, encontrándose mayores niveles en los estadios avanzados y metastásicos (11). El incremento de las metástasis, en células con aumento de actividad Hh-Gli, se ha relacionado con la inducción de EMT (108). Esto apoyaría la teoría de que una modulación de la vía Hh podría tener aplicaciones en medicina regenerativa y terapia antitumoral (110).

1.6. MODELOS DE CÁNCER DE COLON HUMANO

Un modelo es cualquier objeto de imitación, en este caso un ser vivo, que se parece a otro. Generalmente el modelo animal hace referencia a modelos de patologías humanas, y se basa en su analogía en el comportamiento fisiológico y en el desarrollo clínico de la enfermedad con el humano. Actualmente no hay sustitutos reales para los modelos *in vivo*, ya que representan la máxima aproximación a la realidad del organismo en el que aplican.

El significado y la validez de los resultados generados depende de la elección del modelo apropiado. Esto puede resultar difícil ya que no hay unas reglas específicas para este fin (111). Lo que sí parece claro es que, para que los resultados sean reproducibles, los animales deben tener homogeneidad somática (igualdad en sexo, peso, edad...), genética y sanitaria.

Ya en 1987 se describieron más de 4.500 modelos de animales de laboratorio tipificados (112). En los últimos años esta cifra se ha incrementado considerablemente debido a la aparición de animales transgénicos e inmunodeprimidos (113). En el año 2002 en la Unión Europea se utilizaron un total de 10,7 millones de animales para experimentación y otros fines científicos. Los animales más utilizados fueron los roedores y conejos, que suponen cerca del 75% del total. Ha habido un aumento en el uso de peces e invertebrados en los últimos años y reducción de animales grandes (perro, gato, etc) (113,114).

Los animales más utilizados para desarrollar modelos de CCR han sido los roedores, ya que comparten muchas características con los humanos, además de presentar otros atributos como su menor coste y su fácil manipulación. Han demostrado su importancia en la comprensión de muchas facetas moleculares del cáncer de colon, así como en el desarrollo de nuevos fármacos (18,115). Por todo esto, el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) se ha convertido en uno de los animales más atractivos para el estudio del cáncer (116,117), incluido el CCR (30).

Se han desarrollado numerosos modelos de cáncer de colon en animales en un intento de simular la patogénesis de la enfermedad en humanos (118). A continuación resumimos los principales modelos utilizados con este fin.

1.6.1. MODELOS DE CÁNCER ESPONTÁNEO EN ANIMALES

Los perros son similares a los humanos en muchos aspectos del desarrollo del CCR (119). En estos animales aparecen más tumores en colon que en intestino delgado, con morfología de adenoma pediculado en colon izquierdo y recto, mientras que en colon derecho y transversal suelen ser sesiles (120). Los adenomas tienen una tendencia a la malignización (118,121), presentando un acúmulo de β -catenina en el citoplasma y el núcleo, lo que indica que existe una alteración en la vía Wnt (122). Sin embargo, estos cambios no se acompañan de mutaciones en p53 (122,123).

A pesar de las similitudes, el estudio del CCR en estos animales está muy limitado por la baja prevalencia de la enfermedad (menor del 1%) (118,120,124).

En felinos, los adenocarcinomas gastrointestinales tienen una incidencia también menor del 1% y se desarrollan fundamentalmente en intestino delgado (125).

Los adenocarcinomas en ovejas comparten muchos aspectos histológicos y comportamiento metastásico con los humanos; sin embargo, el 100% de los tumores se desarrollan en intestino delgado, lo que sumado a su distinta fisiología al tratarse de rumiantes, dificulta su uso como modelo (18,126).

Entre los primates no humanos, el titi de cabeza blanca (*Saguinus oedipus*) desarrolla adenocarcinomas colorrectales secundarios a colitis ulcerosa (127). Estos tumores raramente se originan sobre un pólipo adenomatoso y metastatizan pronto a los ganglios linfáticos regionales. Se han relacionado más con factores medioambientales que hereditarios (18,128–130). La latencia larga en el proceso de carcinogénesis, los altos costes y las implicaciones éticas impiden extender este modelo (18).

1.6.2. MODELOS EN RATONES CON MODIFICACIONES GENÉTICAS

Los animales modificados genéticamente, los GEMM, pueden arrojar luz sobre el papel de diferentes genes en la aparición de la enfermedad y el papel en las metástasis (144).

1.6.2.1. Mutación APC

El primer modelo de mutación APC en ratones lo desarrolló Morsen. (30,132,133). Estos animales sufren una anemia severa, a veces fatal, atribuida a un gran número de adenomas que aparecen en intestino delgado y colon, lo que se denomina neoplasia intestinal múltiple (MIN). Muchos otros investigadores han generado ratones con mutación en el gen APC en la línea germinal. Esta mutación está presente en todas las células del organismo. Esto lo convierte en un posible modelo para la PAF (18). Aunque los adenomas son similares a los desarrollados en pacientes con PAF, los animales desarrollan un gran número en intestino delgado y menos en el colon, a diferencia de la enfermedad en humanos. Otra desventaja es que raramente progresan a adenocarcinoma invasivo, puede que debido a su corta esperanza de vida (30,132,134).

En 2010 se desarrolló un ratón con mutación APC con mayor esperanza de vida y desarrollo de adenomas y tumores malignos principalmente en el colon, lo que lo asemeja más a la enfermedad humana y debería ser útil para estudiar las alteraciones genéticas asociadas con la secuencia adenoma-carcinoma (30,135).

1.6.2.2. Mutaciones en los genes MMR o reparadores del ADN

Los ratones que son homocigotos para un gen nulo homólogo 1 de MutL (Mlh1) desarrollan defectos en los genes reparadores del ADN que producen inestabilidad de microsatélites (18,136). La alteración de los genes reparadores favorece el desarrollo de linfomas y neoplasias intestinales (18,30,137,138). Los pacientes con CCHNP también tienen aumento de incidencia de neoplasias hematológicas (30,139).

Los ratones Mlh^{-/-} desarrollan cáncer en el tejido linfático y en el intestino y mueren por estos tumores a las 9 semanas (18). Aproximadamente el 70% de los homólogos nulos de MutS 2 (Msh2) desarrollan tumores intestinales después de las 6 semanas de edad, pero mueren a causa de los linfomas (18,140). Los tumores en intestino delgado son más frecuentes en ambos modelos (delección de Mlh1 y de Msh2) (18).

Se han probado modelos con otros genes reparadores que pueden mutar en

CCHNP. Los ratones con alteraciones en PMS1 y PMS2 no desarrollan tumores intestinales, mientras que la eliminación de Msh3 produce adenomas y adenocarcinomas en estómago, intestino delgado, colon y recto (18,141).

Se ha creado un modelo en el que se anula la expresión de Msh 2 en tejidos con vellosidades, fundamentalmente en intestino delgado y grueso, pero con actividad normal en el resto del organismo, lo que hace que no se desarrollen linfomas, pero sí adenomas y adenocarcinomas intestinales (30,142).

1.6.2.3. Otros modelos

Se han desarrollado muchos otros modelos con alteración de genes, como de β -catenina o K-RAS. Todos tienen como finalidad reproducir alteraciones moleculares de enfermedades humanas y sería deseable que cumplieren las características que se indican a continuación:

- Los investigadores deberían ser capaces de modular la expresión de genes que se sabe o se quiere demostrar que afectan al CCR humano.
- También deberían poder controlar el momento en el que se induce el tumor. Al igual que en los cánceres familiares humanos, los ratones transgénicos tradicionales tienen modificaciones en la línea germinal, por lo que expresan la alteración durante la etapa embrionaria. Por el contrario, la mayoría de los cánceres humanos se desarrollan en el adulto. El control del inicio del tumor es una ventaja de los cánceres inducidos químicamente o mediante implante de células tumorales.
- Finalmente, la alteración molecular debería limitarse al colon o al recto. En estos modelos la mutación suele ser en un gen que afecta a todas las células del cuerpo. Aunque se ha aprendido mucho con estos modelos, con frecuencia la existencia de lesiones precancerosas o cancerosas en otros tejidos dificulta el estudio (16).

1.6.3. PROMOTORES EXÓGENOS

1.6.3.1. Dieta occidental

Los estudios epidemiológicos evidencian que la dieta es un potente modulador del riesgo de CCR en humanos (18,143). Se han realizado estudios en ratones para examinar la influencia de la llamada dieta occidental en el desarrollo del cáncer de colon modificando distintos parámetros como el aumento de la concentración de grasa y disminución de los niveles de calcio y vitamina D (18). La alimentación con esta dieta durante 12 semanas induce hiperplasia de las criptas colónicas en ratas y ratones (144). Esto puede prevenirse con un aumento de calcio (145). En otro estudio en ratones se vio que al alimentarlos durante dos años de esta forma se desarrolló atipia nuclear en el epitelio del colon en el 70% de los casos y en el 40% apareció displasia en las criptas. Se vieron lesiones polipoideas sobre todo en el colon distal (18,146).

En otros experimentos similares con dieta con reducción de fibra, folato y metionina se desarrollaron tumores en el 25% de los animales, localizados fundamentalmente en intestino delgado y colon proximal (147). El aumento de calcio y vitamina D prevenían los tumores de colon, pero no se encontraron diferencias al aumentar el aporte de fibra (148).

Aunque estos modelos pueden resultar interesantes para el estudio del CCR humano, tienen sus inconvenientes. No se han descrito los mecanismos moleculares por los que se genera el cáncer. Por otro lado, el nivel de calcio usado es claramente deficiente, lo que puede hacer que no refleje la etiología del CCR humano (18).

1.6.3.2. Inductores químicos

Se sabe que hay un gran número de sustancias químicas que pueden inducir cáncer (18,30,149). Este proceso depende de la duración y dosis del químico. El estado del organismo también juega un papel importante en el desarrollo tumoral (30).

Los compuestos 1,2-dimetilhidrazina (DMH) y su metabolito, azoximetano

(ACM), son los cancerígenos más usados para promover el CCR en ratones (18,150). Son agentes alcalinos que se inyectan en el tejido subcutáneo o peritoneo durante varias semanas y que inducen tumores en el colon distal. La mayoría de estos tumores tiene mutaciones en el gen β -catenina, al igual que ocurre en el CCHNP (151), lo que hace que esta proteína sea resistente a la degradación e incrementa la señalización de Wnt (18,152). La incidencia de tumores en este modelo se modifica según el fondo genético o la dieta (150). Esto lo hace útil para el estudio de interacciones gen-gen o gen-medioambiente. Sin embargo, no hay evidencia de que la aparición de la mayoría de tumores de colon se deba a la exposición a agentes alcalinos, lo que hace que los resultados no se puedan trasladar a humanos (18).

Otro agente utilizado como carcinógeno es la 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP). Es una amina que se produce al cocinar carne o pescado (18,153) y un conocido mutágeno en ratas (154). En ratones produce criptas aberrantes pero no tumores de colon a menos que se asocie con otros carcinógenos o alteraciones genéticas previas (155,156). Los tumores se suelen desarrollar en el colon medio o distal con morfología polipoide. La invasión y metástasis son poco frecuentes (18).

Se han utilizado otras sustancias como carcinógenos, pero un inconveniente de estos modelos es el escaso desarrollo metástasis (18).

1.6.4. IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

Se han desarrollado muchos modelos para controlar la implantación o inyección de tumores. Los ratones Nude, con pérdida de función de células T, o los SCID, con pérdida de función de células T y B, han sido muy útiles para el desarrollo de esta técnica (30).

1.6.4.1. Enemas

Se han utilizado enemas para introducir en el colon células tumorales precedidas de una sustancia irritante con el fin de inducir colitis. Takahashi (149) utilizó sodio sulfato

de dextrano (DSS) como agente irritante para inducir colitis en un tramo corto de colon en ratones Nude, tras lo cual instilaba células de cáncer de colon humano LS174T por vía transanal. Se produjeron tumores en recto en el 95% de los animales, pero no se observaron metástasis (118,157).

En otro estudio se utilizó una solución de ácido acético seguida de solución salina tamponada con fosfato (PBS) para romper la capa de células epiteliales de la mucosa distal del recto. Después inoculaban por vía transanal células de cáncer colorrectal murino CT-26 y de cáncer colorrectal humano HCT-116, que expresaban proteína fluorescente verde, con ayuda de un microscopio de fluorescencia. Se observó crecimiento tumoral en el 100% de los casos y metástasis ganglionares y pulmonares en el 90%. La mayor desventaja de esta técnica es que no se puede utilizar para estudiar tumores de colon, pues el trasplante de células sólo es en el recto (118,158).

1.6.4.2. Microinyección

Donigan (159) publicó un estudio en el que inyectaron células de cáncer de colon murino CT-26 en la pared del recto usando un microscopio óptico, pero los tumores que aparecen con esta técnica no se originan en la mucosa. La incidencia de tumor fue del 65% y de metástasis del 3,3% (118,159).

Zimong (160) usó una técnica similar que consistía en implantar células de cáncer de colon murino y humano mediante colonoscopia murino, desarrollando tumor el 95% de los casos, sin aparición de metástasis. Esta técnica sólo se podía realizar en el recto distal (118,160).

1.6.4.3. Electrocoagulación transanal

En un estudio de 2010 publicado por Bhuller (153) se describe una técnica en la que por vía transanal realizaban electrocoagulación en la mucosa del colon, tras lo que instilaban células de CCR humano (LS-174T y HT-29) y murinas (CRL-2638 y CRL-

2639). Se desarrollaron tumores en el 87,5%, con metástasis linfáticas y a distancia en el 66,6% de los casos. Con esta técnica la inoculación se realiza en lecho no isquémico y se puede realizar un seguimiento por colonoscopia (118,161).

1.6.4.4. Técnica quirúrgica

Se han desarrollado muchos modelos para implantar células tumorales. Se han realizado alotrasplantes y xenotrasplantes de células de cáncer de colon humano, comerciales u obtenidas de muestras quirúrgicas .

A continuación haremos referencia a algunas de estas técnicas quirúrgicas.

Trasplante heterotópico

Uno de los primeros modelos desarrollados fue el trasplante heterotópico, implantando células de cáncer de colon humano en el tejido subcutáneo de ratones Nude o SCID. En este modelo, el crecimiento se puede monitorizar fácilmente, sin embargo, al estar situado extraabdominalmente, no desarrolla metástasis (118). Algunos autores han utilizado esta técnica como paso previo a realizar un trasplante ortotópico, utilizando el tumor subcutáneo para la obtención de células tumorales que se implantan en el colon de otros ratones (118,162,163). Pocard (156) inyectó células tumorales en tejido celular subcutáneo de los flancos del ratón. Cuando el volumen tumoral era mayor de 1cm³, sacrificaban al animal y hacían secciones del tumor de 2x2x2mm que se implantaban en la pared del ciego de otros animales (118,164).

La cápsula del bazo y riñón también se han usado como sitio de implantación (118).

Trasplante ortotópico

Hoy en día el modelo ortotópico se considera el más avanzado y el que mejor simula el proceso de desarrollo del cáncer de colon humano. Los investigadores han descrito múltiples técnicas quirúrgicas para la implantación tumoral (118).

PDX

Los PDX (patient derived xenograf) son muestras tumorales extraídas de los pacientes (Figura 8). Tienen la ventaja de que el animal recibe el componente celular tumoral e inflamatorio peritumoral. Sin embargo, tiene limitaciones, pues implica el uso de animales que carecen de sistema inmune, el estroma que se forma es murino y no humano y a veces no se desarrollan metástasis (165).



Figura 8. Implante de la muestra de tumor en ciego de ratón en uno de nuestros ratones.

Esta técnica consiste en implantar secciones de tumor en el colon del ratón. Las piezas se obtienen de tumores en fresco y deben ser implantadas en las primeras 24 horas. Fu (166) describe esta técnica en la que realizan un “flap” de serosa en la pared del ciego e implantan la sección de tumor mediante un punto. Realizaron otros experimentos implantando previamente o en la misma cirugía, una esponja hemostática “*gelfoam*” para incrementar la vascularización en el lugar de implantación. Obtuvieron crecimiento tumoral y metástasis hepáticas en todos los modelos sin diferencias significativas entre ellos (166).

En otro estudio se describe el uso de secciones en fresco de una metástasis de cáncer de colon humano que se implantaron en la serosa del colon, en el hígado y en el tejido subcutáneo de ratones Nude. En 3-4 meses se obtuvo crecimiento tumoral en todos los lugares de implantación, pero sin metástasis. Tras 10 generaciones de retrasplante colon-colon de secciones de este tumor en un periodo de 2 años, apareció un 100% de metástasis masivas en hígado, 11% esplénicas y 43% en ganglios del hilio hepático. Cuantos más retrasplantes se realizaban, aparecía mayor número de metástasis y en más localizaciones. Los autores atribuyeron estos hallazgos a la “teoría de la remetástasis” (10).

CÉLULAS

Esta técnica consiste en la implantación de células de cáncer de colon en la pared del ciego de los animales. Se han descrito múltiples modelos con utilización de distintas líneas celulares. Describiremos algunas a continuación (118).

Otaga (167) utilizó células de la línea KM12SM y las inyectaron en la pared del ciego de ratones Nude. Apareció tumor en el 100% de los casos, metástasis en ganglios regionales en el 25% y en hígado en el 50% (118,167).

En otro estudio se comparaban los modelos de trasplante subcutáneo, ortotópico e intraesplénico. Trasplantaron células de cáncer de colon humano de las líneas HT-29 y HCT116 infectadas con gonadotropina coriónica humana y luciferasa, en la pared del ciego de ratones SCID bajo visión microscópica con un aumento de 4x. El desarrollo tumoral producía β -HCG y proteína luminiscente luciferina. Obtuvieron tumor en el 87-100% de los casos, metástasis ganglionares y hepáticas en el 50% y pulmonares en el 25%. En el modelo intraesplénico se producía una rápida colonización de células tumorales en hígado y pulmones y los tumores alcanzaban gran tamaño en pocas semanas. Un inconveniente de esta técnica es que precisa entrenamiento especial e instrumentos apropiados (118,168).

Priolli (169) diseñó una técnica en la que realizaban una derivación del colon mediante una fístula distal. Inyectaban las células tumorales en la fístula submucosa. Se monitorizó el crecimiento tumoral mediante gammagrafía con ^{99m}Tc -MIBI. La fístula distal facilitó el seguimiento y la evaluación del efecto de los tratamientos administrados.

Obtuvieron crecimiento tumoral en el 42,8% de los casos, sin aparición de metástasis (118,169).

1.6.5. ORGANOIDES

En los últimos años se han desarrollado organoides, que son conjuntos de células cultivadas “*in vitro*” formando una estructura tridimensional. Sus características anatómicas y funcionales son más parecidas a las del órgano original. Se han realizado a partir de células madre sanas y tumorales, lo que permite estudiar el comportamiento y la reacción a fármacos en ambos casos (170).

En teoría, el uso de organoides en una muestra tumoral de un paciente, permitiría conocer específicamente la expresión de genes implicados en el comportamiento del tumor, lo cual permitiría aplicar un tratamiento específico o personalizado. Sin embargo, la heterogeneidad intratumoral (171) implica que las “características moleculares” varían dentro de un mismo tumor, por lo que el comportamiento del mismo no se puede inferir exclusivamente a partir de unas muestras seleccionadas del tumor.

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de colon se encuentra entre los de mayor incidencia a nivel mundial. A pesar de la mejoría en el screening, así como en los tratamientos, tanto quirúrgicos como quimioterápicos, aún existe un número importante de pacientes que desarrolla metástasis y muere por esta causa. Se ha visto que el estroma y los fibroblastos peritumorales podrían influir en el desarrollo y progresión del cáncer de colon. El estudio de esta relación nos puede permitir un mayor conocimiento de la evolución del tumor y, en algunos casos, administrar tratamientos individualizados. Para el estudio de estos posibles tratamientos sería útil disponer de un modelo animal de cáncer de colon que tuviese en cuenta el papel de los CAFs.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

3.1. HIPÓTESIS CONCEPTUAL

Los fibroblastos de la matriz peritumoral facilitan el crecimiento e invasión del tumor.

3.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. Los fibroblastos peritumorales, CAFs, tienen características diferentes de los no tumorales que explicarían su papel en el crecimiento tumoral.
2. El xenotrasplante de células tumorales humanas con fibroblastos a ratones inmunodeprimidos produce un mayor crecimiento y capacidad metastásica.
3. El mayor contenido de estroma y fibroblastos peritumorales en el adenocarcinoma de colon se relaciona con el pronóstico.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

1. Obtención, cultivo y curvas de crecimiento de fibroblastos normales y peritumorales de muestras quirúrgicas de adenocarcinoma de colon humano.
2. Desarrollo de un modelo de xenotrasplante de cáncer de colon humano en ratones inmunodeprimidos, asociando o no fibroblastos peritumorales.
3. Análisis retrospectivo de pacientes intervenidos de cáncer de colon, analizando las muestras anatomopatológicas de dichos tumores con distintas tinciones para valorar la relación entre matriz peritumoral y pronóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS QUIRÚRGICAS

Para la realización de este estudio se recogieron muestras quirúrgicas de tumores de colon intervenidos en el Hospital Universitario Central de Asturias. No incluimos el cáncer de recto. Se obtuvo previamente el consentimiento informado del paciente (Anexo 3) y la autorización del Comité de Ética.

Una vez realizada la colectomía, la pieza se introdujo en una cubeta con hielo de forma aséptica y se trasladó al Servicio de Anatomía Patológica en menos de 10 minutos postextracción. En condiciones de “semiasepsia” (pañó estéril, instrumental), el anatomopatólogo abrió la pieza por el borde antimesentérico, realizó un lavado de la misma con agua durante 10 minutos y posteriormente con 500 ml de suero fisiológico para evitar contaminación en los futuros cultivos.

El anatomopatólogo obtuvo muestras de aproximadamente 0,5cm, por triplicado, de tejido normal, peritumoral y tumoral (en cada zona con un bisturí distinto para evitar contaminación), introduciendo dos de ellas en criotubos y éstos a su vez en nitrógeno líquido, y la tercera en tubos con líquido de conservación RPMI-1640 Medium (Gibco, Invitrogen) suplementado con amikacina y vancomicina (Laboratorios Normon, Madrid, ambas a 40µg/ml). Las muestras en nitrógeno líquido se utilizaron posteriormente para estudio de genes y las otras para cultivo de células. Se intentó obtener más cultivos pero estos se contaminaban muy fácilmente.

Las muestras para trasplante se obtuvieron del siguiente paciente:

- Trasplante HT-29 + fibroblastos en cabeza de páncreas: varón de 80 años con adenocarcinoma de sigma moderadamente diferenciado, pT3 pN0.

Los CAFs para cultivo se obtuvieron de tres casos:

- Varón de 80 años con adenocarcinoma mucosecretor bien diferenciado, de colon derecho, pT2pN0.
- Mujer de 72 años con adenocarcinoma de sigma moderadamente diferenciado, pT3

pN0.

– Varón de 56 años con una recidiva de adenocarcinoma de sigma moderadamente diferenciado, pT3pN0.

5.2. CULTIVOS

5.2.1. CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Pocos minutos tras la intervención quirúrgica, se obtuvieron muestras del tumor de colon (destinadas a distintos fines: cultivo, estudio inmunocitoquímico, expresión de genes), del área peritumoral (para CAFs) y del área normal (para "fibroblastos normales", NF) utilizando diferentes hojas de bisturí para evitar la contaminación. La ausencia de células tumorales en las muestras obtenidas de las áreas peritumoral y normal se verificó por microscopía. Las muestras se cortaron en fragmentos más pequeños. El procedimiento de cultivos celulares ha sido publicado previamente (Figura 9) (99).

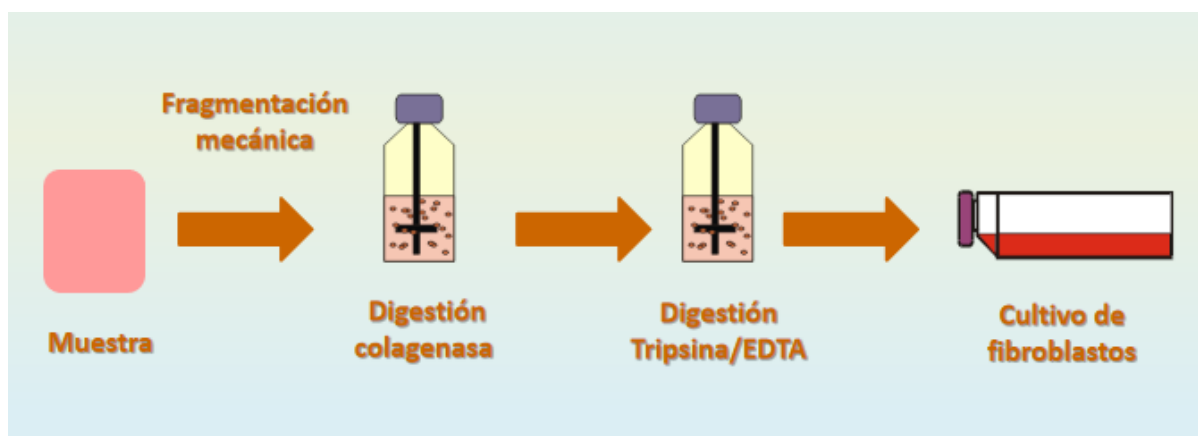


Figura 9. Esquema del cultivo de fibroblastos. (García Pérez E. Cultivo de células peritumorales (CAFs). Estudios preliminares. Comunicación presentada en el Congreso de la SEIQ 2012).

Los fragmentos se digirieron enzimáticamente con colagenasa tipo I (2mg/ml) entre 1 y 2 horas. Después de la digestión, la solución se centrifugó a 400g durante 10

minutos. El sedimento se suspendió en un medio de cultivo de fibroblastos (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen)) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y antibióticos (amikacina y vancomicina (40µg/ml)). Los fragmentos de tejido que no habían sido digeridos con colagenasa se sometieron a una segunda digestión con 0,05% de tripsina y 0,02% de EDTA (T/E, Gibco, Invitrogen), entre 30 y 60 minutos. La solución de T/E se recogió en un tubo y se inactivó con la misma cantidad de medio de cultivo. Se centrifugó a 400g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en medio de cultivo.

Las células obtenidas tanto de digestión de colagenasa como de tripsina, se sembraron en placas de seis pocillos utilizando medio de cultivo de fibroblastos y se mantuvieron a 37 ° C en una incubadora con CO₂ al 5%. El medio se cambió cada 3 días.

Cuando los cultivos primarios fueron confluentes, las células se lavaron dos veces con PBS y se trataron con T/E hasta que se despegaron completamente de la superficie de la placa. La T/E conteniendo las células se neutralizó con medio de cultivo y se centrifugó a 400g durante 10 minutos. El pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo y las células se sembraron doblando la superficie inicial.

Todas las células del estroma se usaron en pases tempranos (pases 3-6). La pureza celular de las células del estroma se evaluó por morfología e inmunotinción con vimentina.

Ambos tipos de células (NF y CAFs), se sembraron en placas de seis pocillos a una velocidad de 1×10^4 células viables por pocillo, utilizando el medio de cultivo descrito previamente. Cada 2 días, uno de los platos se tripsinizó y las células se contaron en una cámara Neubauer. Los pocillos no se llenaron en ningún caso, por lo que no hubo inhibición de contacto.

Después de contar en la cámara de Neubauer, se evaluó la morfología de la pureza celular de las células del estroma y la inmunotinción con vimentina como marcador de fibroblastos, y con mAb anti-proColX α 1 (DMTX1, Oncomatryx) como marcador específico para CAFs humanos (112,113,185). Las células restantes se congelaron, usando DMEM + FCS al 10% y DMSO al 10% como crioprotector, en crioviales. Éstos se mantuvieron en un congelador a -80°C durante 24 horas y luego se transfirieron a un recipiente de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

5.2.2. CULTIVO DE CÉLULAS HT-29

La línea comercial HT-29 (ATCC® HTB-38™) procede de un adenocarcinoma colorrectal humano de una mujer caucásica de 44 años del grupo sanguíneo A, Rh⁺. Las células se aislaron del tumor primario en 1964 por J.Fogh. Estas células son epiteliales con capacidad de adherencia y de producir mucina. Expresan los genes del antígeno carcinoembrionario (CEA) y del componente secretor de la IgA, así como oncogenes *MYC*, *RAS*, *MYB*, *FOS*, *SIS* y *P53*. (186). Las células HT-29 (ATCC® HTB-38) se cultivaron en medio estándar DMEM con 10% FBS (suero bovino fetal). Todos los cultivos se llevaron a cabo en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire a 37 ° C. Los pases de cultivo y la recolección de células se realizaron con tripsina / EDTA 0.05% / 0.02% (Biochrom).

5.2.3. INMUNOFLUORESCENCIA DE CÉLULAS ESTROMALES CULTIVADAS Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células cultivadas obtenidas de muestras quirúrgicas, se fijaron en acetona a -20°C durante 10 minutos, se secaron a temperatura ambiente y luego se lavaron en Dako buffer durante 30 minutos. La metodología utilizada se ha descrito anteriormente (99). Las muestras se incubaron con anti-proColX1 α 1 (DMTX1, Oncomatrix), citoqueratina 19 (CK19), alfa-actina de músculo liso (α SMA) y vimentina (VIM), a temperatura ambiente, en las condiciones especificadas en la Tabla 6. El anti-proColX1 α 1 es un marcador específico de los CAFs, la α SMA y la vimentina tiñen los CAFs así como los fibroblastos activados, y la CK19 marca las células tumorales epiteliales.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron green anti-rabbit Alexa-488 y red anti-rabbit Alexa-546, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se montaron con medio de montaje que contenía diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Labs). La colocalización se visualizó y fotografió utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2 a 63X y 100X, con las siguientes fuentes de excitación de cada fluorocromo: Argón/Krypton laser (488nm), Helium/Neón laser (546nm) y azul-violeta

Diodo (405nm).

Anticuerpo primario (especies)	Clon	Referencia comercial	Dilución	Tiempo de incubación (min)
anti-procollagenXI α 1 (mAb)	1E8.33RCK108	DMTX1/ Oncomatrix, España	1:400	30
CK 19 (mAb)	RCK108	Dako, Dinamarca	1:50	15
α -SMA (mAb)	1A4	Dako, Dinamarca	Prediluido	20
Vimentina (pAb)	C-20	Santa Cruz Biotech, Alemania	1:400	10

Tabla 6. Inmunocitoquímica (ICQ). mAb: anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal

5.3. IDENTIFICACIÓN DE CAFs HUMANOS EN LOS XENOTRASPLANTES

Los CAF se marcaron con colorante celular de fluorescencia roja PKH26 (Sigma-Aldrich PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling). El vehículo del marcador provisto en los kits (Diluyente C) fue diseñado para mantener la viabilidad celular, mientras maximiza la solubilidad del colorante y la eficiencia de tinción durante la etapa de marcaje. Debido a ello, las células presentan fluorescencia extremadamente estable y PKH26 es el colorante de enlace celular de elección para estudios de rastreo de células *in vivo*. PKH26 consiste en una molécula alifática que se incorpora a la membrana celular, unida a un tinte fluorescente similar a la rodamina. La longitud de onda de excitación óptima es 551 nm y la longitud de onda de emisión es 567 nm. Los CAFs se inyectaron en el páncreas de ratones. Después de 7 días, los ratones se

sacrificaron y las muestras de tumor se incluyeron en Tissue-Teck OCT (Thermo) y se congelaron en nitrógeno líquido. Secciones de cinco micrómetros de espesor se almacenaron a -80 ° C. Las secciones se fijaron en acetona (-20°C, 10 minutos) y se incubaron con mAb anti-proColXI α 1 (Oncomatryx, 1: 400, 30 minutos)-secundaria Alexa 488 (1: 500, Invitrogen). Los núcleos se contratiñeron con hidrato de diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Labs). Para documentar la presencia y el origen humano de los CAFs en secciones tumorales de ratones, se analizaron varias secciones por ratón mediante microscopía confocal. Las células positivas para PKH26 presentaron fluorescencia roja y las células positivas pro-ColXI α 1 presentaron fluorescencia verde.

5.4. XENOTRASPLANTE HETEROTÓPICO DE CÉLULAS HT-29 EN LA CABEZA DEL PÁNCREAS

5.4.1. RATONES

El ratón común (*mus musculus*) es uno de los animales más utilizados para experimentación (Tabla 7). Comenzaron a utilizarse en biomedicina a finales de siglo XIX por su pequeño tamaño, su fácil manejo, su variabilidad genética y su alta tasa reproductiva. Actualmente existen más de 1.000 cepas congénitas genéticamente definidas (174).

Orden	Suborden	Familia	Género/especie
Rodentia	Myomorpha	Muridae	<i>Mus musculus</i> (ratón común)

Tabla 7. Taxonomía del ratón común.

Estos animales son roedores, tienen incisivos que crecen de forma continua por lo que presentan la necesidad de roer. Se alimentan principalmente de vegetales, especialmente semillas, aunque pueden comer prácticamente de todo, desde insectos hasta

raíces. El estómago, al igual que el de la rata, está constituido por una porción glandular y otra muscular (o no glandular). Tienen un tubo digestivo relativamente largo y un ciego grande con una flora bacteriana que asegura la digestión (lisis) de la celulosa y la síntesis de vitaminas hidrosolubles. Los ratones caseros pueden adaptarse fácilmente a la escasez de agua consumiendo vegetales y concentrando la orina (175)

Los trasplantes se realizaron en ratones inmunodeprimidos tipo SCID BALB/cJHanHsd-Prdkscid (Envigo, Spain). Todos los ratones eran machos de 4 a 10 semanas de edad. Tras su llegada a nuestras instalaciones se esperó durante una semana para que se aclimataran a su nuevo entorno.

Ratones SCID

Los ratones SCID (Severe Combined Immune Deficiency) (Figura 10) son homocigotos para el gen recesivo scid, localizado en el cromosoma 16, lo que causa una deficiencia funcional en los linfocitos T y B (176).

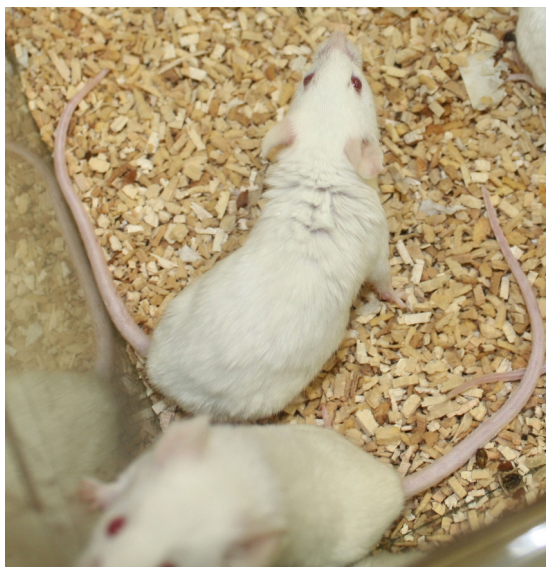


Figura 10. Ratones SCID.

La mutación SCID (severe combined immunodeficiency) es autosómica recesiva. Apareció espontáneamente en el año 1980 en el Fox Chase Cancer Center de Filadelfia (Estados Unidos) en una línea congénita de BALB/c. El locus scid fue mapeado en 1989 en el cromosoma 16. El responsable es el gen Prkdc (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide), un gen de reparación del ADN cuya alteración causa la falta de recombinación somática en los genes V(D)J de las inmunoglobulinas y los receptores TCR de los linfocitos T, lo que bloquea la diferenciación temprana de los linfocitos B y T.

Los ratones homocigotos scid/scid (ratones SCID) tienen una apariencia externa normal. Sin embargo, los ganglios linfáticos, el bazo y el timo son anormalmente pequeños, presentando este último una médula rudimentaria y ausencia de corteza. Carecen además de linfocitos y células plasmáticas y tienen niveles muy bajos o ausencia de inmunoglobulinas en suero. El déficit de células T y B maduras hace que estos animales sean incapaces de generar una respuesta inmune, tanto humoral como celular. La mutación no altera las líneas mieloide ni eritroide, presentando estos animales unos niveles de actividad NK normales (175)

5.4.2. BIOTERIO

Los animales permanecieron en la Unidad de Bioterio de la Universidad de Oviedo. Este es un centro de investigación científica que cuenta con instalaciones homologadas para la cría y mantenimiento de animales de experimentación, que permanecen controlados en condiciones ambientales constantes. También disponen de laboratorios para manipulación y toma de muestras. Está registrado con el n.º 33443591 en la Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias como centro de cría y usuario de animales de experimentación, en cumplimiento del R.D.53/2013 (177).

Los bioterios, animalarios, estabularios, barreras y/o Servicios o Centros de Producción y/o Experimentación Animal son centros que se dedican a la obtención de animales de laboratorio. Estos centros tienen como funciones principales la producción y mantenimiento de reactivos biológicos. En ellos se controla la entrada de animales y personas y se vigila la alimentación, bienestar y estado de salud de los animales. Muchos

de estos centros forman parte de los servicios técnicos de apoyo a la investigación o centros de instrumentación científica de universidades, hospitales, centros de investigación o laboratorios (126).

Los animales permanecieron alojados en una sala especial para inmunodeprimidos, en rack ventilado y con aire filtrado y se utilizó una campana de flujo laminar para su manipulación.

5.4.3. TRASPLANTES

Los trasplantes se realizaron en la sala de inmunodeprimidos, bajo la campana de flujo laminar y en condiciones de asepsia adecuadas. Antes de entrar a esta sala es preciso vestirse con un traje especial, gorro, guantes y mascarilla. Se extrajeron las jaulas una a una y se colocaron bajo la campana de flujo laminar, donde se realizó todo el procedimiento.

5.4.3.1. Anestesia

Previamente al procedimiento de anestesia, se registró el peso de los animales y quince minutos antes de comenzar la intervención se administró buprenorfina 0,05mg/kg por vía intraperitoneal. Utilizamos anestesia inhalatoria para dormirlos según el siguiente protocolo: para la inducción anestésica se colocó el ratón en la cámara de inducción regulando el vaporizador al 5% de isoflurano y flujo de oxígeno a 0.5-1.0 l/min. Cuando el animal perdió la consciencia se sacó de la cámara y se situó en la tabla de operaciones colocándole la mascarilla. Para el mantenimiento anestésico se reguló el vaporizador al 2%. Al finalizar la intervención se desconectó el vaporizador de isoflurano y después el oxígeno (0,5 l/min), se dejó al animal ventilando con oxígeno al 100%, en función de su recuperación. Por último, administramos meloxicam 1,5-2 mg/kg, vía intraperitoneal. Se repitieron las dosis de buprenorfina y meloxicam cada 24h durante 2 días.

5.4.3.2. Trasplante

Una vez dormido se puso un clip de identificación en la oreja del animal y se colocó en la tabla operatoria. Se afeitó la zona abdominal sin producir heridas y se limpió tórax y abdomen con povidona yodada.

Se realizó una laparotomía de 1-2 cm con tijeras finas. Exploramos la cavidad identificando el estómago y cabeza pancreática y extrayéndolo fuera de la cavidad sobre gasas estériles. Se inyectó lentamente, en unos 30 segundos, a través de una aguja de 30 G, la solución de células (HT-29, CAFs, NF, según el modelo que se describirá más adelante) en la cabeza del páncreas a nivel del píloro. Al extraer la aguja, presionamos inmediatamente la zona con suavidad con una gasa, durante un minuto.

Recolocamos las vísceras en el abdomen y procedimos al cierre de la laparotomía, que se realizó en dos planos, peritoneo-músculo en sutura continua y piel con puntos sueltos, ambas con material reabsorbible multifilamento de 4-5/0.

Se observó a los animales cada día, pesándolos cada 7 días y administrando analgesia las primeras 48 horas según el protocolo de anestesia descrito previamente. Así mismo, se supervisó a los animales proporcionándoles los cuidados necesarios para evitar dolor o sufrimiento. Se mantuvo un ambiente adecuado para asegurar su bienestar y reducir los niveles de estrés y ansiedad mediante enriquecimiento ambiental.

5.4.3.3. Eutanasia

Tras el periodo establecido después del trasplante, procedimos al sacrificio de los animales. Para este proceso utilizamos una campana de CO₂. Una vez muerto se afeitó el abdomen del ratón y se colocó en la tabla operatoria. Realizamos una laparotomía con tijeras finas por ambos flancos abdominales ampliando hasta el tórax. Se exploraron todos los órganos de abdomen y tórax, registrando dónde se encontró tumor macroscópico y su tamaño. Extrajimos todos los órganos y los introducimos en un tubo con formol, separando previamente el órgano donde se encontraba el tumor primario del resto.

En algunos casos donde aparecieron tumores de mayor tamaño, se recogieron

muestras del tumor primario y/o de metástasis hepáticas en criotubos en nitrógeno líquido.

5.4.3.4. Análisis anatomopatológico

Las muestras fueron analizadas por personal del Departamento de Histopatología Molecular en Modelos de Cáncer Animal del IUOPA (Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias). Las muestras se fijaron durante 24 h en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente, se embebieron en parafina, realizándose secciones de 5 μm de espesor que se tiñeron con hematoxilina-eosina y mAb anti-proColXI α 1 (DMTX1, Oncomatryx). El volumen del tumor que se desarrolló en el páncreas se calculó en mm^3 con la fórmula *eje mayor* \times (*eje menor*)² \times 0,52. Para evaluar el tamaño de las metástasis hepáticas, se realizó la seriación completa de cada hígado, seleccionando para el estudio secciones del tejido a intervalos de 200 μm . Se contabilizó el número de metástasis hepáticas en las secciones histológicas y se clasificaron por su tamaño en pequeño, mediano y grande, dándoles un valor de 1, 2 ó 3, respectivamente, como medida de la “carga” del tumor hepático. Se consideró un tamaño de metástasis pequeño cuando ésta se identificó en una sola sección ($\leq 400 \mu\text{m}$), medio cuando se identificó en dos secciones consecutivas ($> 400\mu\text{m}$ y $\leq 600 \mu\text{m}$) y grande cuando se identificó en tres o más secciones ($> 600 \mu\text{m}$). Por lo tanto, un animal con un hígado que contiene una metástasis pequeña, una metástasis mediana y una grande, se clasificó con una carga tumoral de 6 ($1 \times 1 + 1 \times 2 + 1 \times 3 = 6$). Para los tumores identificados en el páncreas, establecimos un score histopatológico de 3 a 9 puntos, para comparar la gravedad o la agresividad del tumor, basado en tres características histopatológicas: volumen tumoral, desmoplasia y número de órganos con metástasis. La valoración se realizó según se describe en la tabla 8.

	Puntuación 1	Puntuación 2	Puntuación 3
Volumen tumor	Pequeño ($<50\text{mm}^3$)	Mediano ($50\text{-}150\text{mm}^3$)	Grande ($>150\text{mm}^3$)
Desmoplasia	Leve	Leve/moderada, moderada	Moderada/severa
Nº de órganos con metástasis	1-2	3-4	>4

Tabla 8. Sistema de puntuación histopatológico de la agresividad del tumor.

5.4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Basándonos en la hipótesis de que los fibroblastos peritumorales incrementan la agresividad tumoral, realizamos distintos experimentos con el objetivo de generar un modelo de cáncer de colon humano en ratones siguiendo los protocolos expuestos previamente.

Xenotrasplante heterotópico de células HT-29 en la cabeza del páncreas

La mayoría de modelos de cáncer de colon por medios quirúrgicos se han realizado en el ciego. Los trasplantes en la pared del ciego presentan una dificultad añadida por el escaso espesor de la pared y la facilidad con la que se extravasa el preparado celular, por lo que muchos trasplantes pueden resultar fallidos. Debido a esto y a nuestra experiencia en trasplantes de células en páncreas, decidimos desarrollar este modelo de cáncer de colon. En estudios previos realizados por el grupo del Dr. Barneo se comprobó que en el caso de xenotrasplante de cáncer de páncreas, los ratones SCID desarrollaron tumores agresivos (178).

Para este modelo se utilizaron fibroblastos peritumorales (CAFs) y normales (NF)

obtenidos de muestras frescas de cáncer de colon humano y células de la línea HT-29, realizando cuatro grupos experimentales

- I. Se trasplantaron 150.000 CAFs en 12 ratones.
- II. Se administraron a 7 ratones 1,5 millones de células HT-29.
- III. En 5 ratones trasplantamos 1,5 millones de células HT-29 + 150.000 NF.
- IV. En 10 ratones se inyectaron 1,5 millones de células HT-29 + 150.000 CAFs.

Se utilizaron ratones SCID machos de 6 semanas. Los preparados celulares se inyectaron en la cabeza pancreática de los animales, que fueron sacrificados un mes después.

5.5. CUANTIFICACIÓN DE ColXI α 1 EN MUESTRAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO

Con el fin de estudiar la relación entre el ColXI α 1 presente en el tumor de colon y el pronóstico de la enfermedad, realizamos un estudio retrospectivo en 189 pacientes intervenidos de cáncer de colon en nuestro centro.

5.5.1. RECOGIDA DE DATOS

Se seleccionaron los casos de cáncer de colon que fueron intervenidos en los años 2004 a 2006 en el Hospital Universitario Central de Asturias, excluyéndose los pacientes con cáncer de recto y los tumores no resecaos. Se recogieron datos sobre el paciente y la evolución de su enfermedad (Anexo 2).

5.5.2. MUESTRAS ANATOMOPATOLÓGICAS

Se analizaron 189 casos de cáncer de colon intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Universitario Central de Asturias, seleccionando las biopsias del archivo del Servicio de Anatomía Patológica, entre 2004 y 2006. Todas las muestras representativas de cada tumor habían sido fijadas con formaldehído al 10%, incluidas en parafina y teñidas con Hematoxilina-Eosina para el examen histológico.

El bloque de parafina más representativo del tumor de cada caso, con mayor infiltración de la pared, fue seleccionado por un patólogo, realizándose posteriormente dos secciones consecutivas de 3 micras de grosor de dicho bloque de parafina. En una de las secciones se realizó tinción histoquímica para colágeno con tricrómico verde de Gomori (Kit comercial, ArtisanLink, Angilent/DAKO, Ref. AR 166). En la otra sección, se realizó tinción inmunohistoquímica automatizada (OMNIS, Angilent/DAKO) con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-proColXI α 1 (DMTX/1E8.33.Oncomatrix, España). La recuperación antigénica se realizó por calentamiento con tampón a pH alto durante 30 minutos. Las muestras fueron incubadas a 37° C con el anticuerpo DMTX (dilución 1:400 en Envision Flex Antibody Diluent) durante 20 minutos con EnVision HRP Flexsystem y teñidas con DAB (3-3''- Diaminobenzidine) durante 5 minutos. Finalmente, las secciones fueron contrastadas con Hematoxilina durante 7 minutos.

La tinción histoquímica de Gomori y la inmunohistoquímica con DMTX de cada caso seleccionado, fueron estudiadas por un patólogo, que marcó en ambos portaobjetos una misma zona que incluía el área tumoral más infiltrante. Posteriormente, estas zonas marcadas fueron evaluadas con un programa de análisis de imagen en las instalaciones de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

5.5.3. OBTENCIÓN DE IMÁGENES

El objetivo de este experimento fue medir el porcentaje de marcaje de proColXI α 1 en células peritumorales (CAFs), así como el porcentaje de tejido teñido con Gomori (matriz colágena) en la zona tumoral marcada de cada caso.

Para obtener las imágenes utilizamos un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 en el equipo de estereología CAST2. Es un microscopio óptico automatizado para estudios de transmisión y fluorescencia con platina motorizada Prior. Óptica: UPlanSApo 4x/0.16; UPlanApo 10x/0.40; UPlanSApo 20x/0.75; PlanApo 40x/0.95 y UplanSapo100x/1.40 Oil. Bloque de filtros para fluorescencia: UV (BP 360-370), Azul (BP470-490), Verde (BP530-550). Cámara digital en color Olympus DP-70 con resolución de 4080 x 3072 pixels, (12 Mpixels) (Figura 11).



Figura 11. Microscopio de fluorescencia Olympus BX61 en el equipo de estereología CAST2.

Trabajamos con dos tipos de imágenes, por un lado las correspondientes a las células marcadas con anti-proColXI α 1, que se toman con un objetivo de 20x y un tamaño de imagen de 1360 x 1024 píxeles, de las que se analizan un número determinado de campos al azar (entre 20 y 30) (Figura 12 y 13).

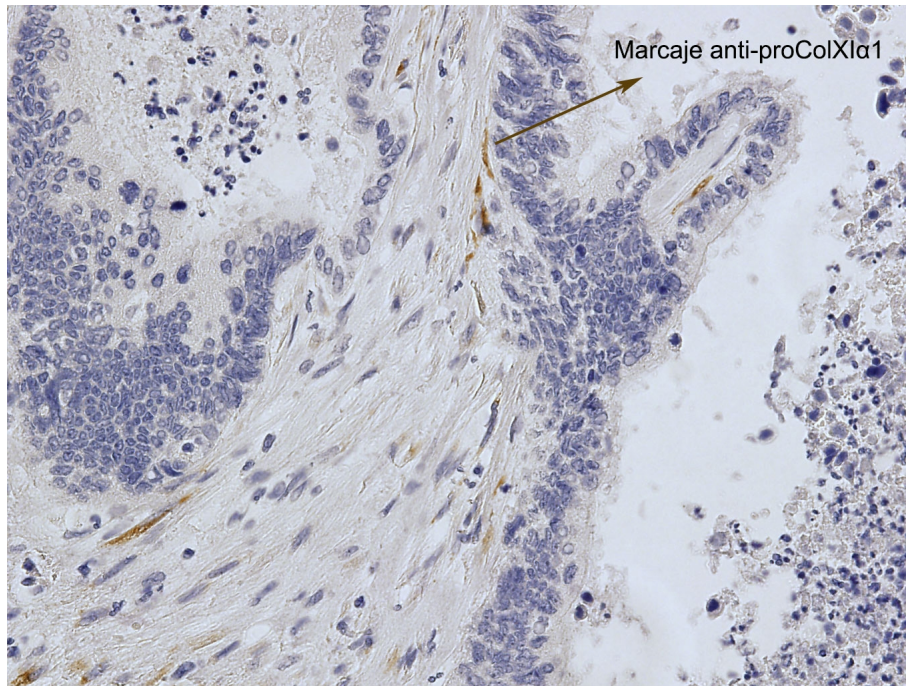


Figura 12. Imagen de muestra marcada con anti-proColX1 α 1. Imagen tomada con un objetivo de 20x y un tamaño de imagen de 1360x1024 píxeles.

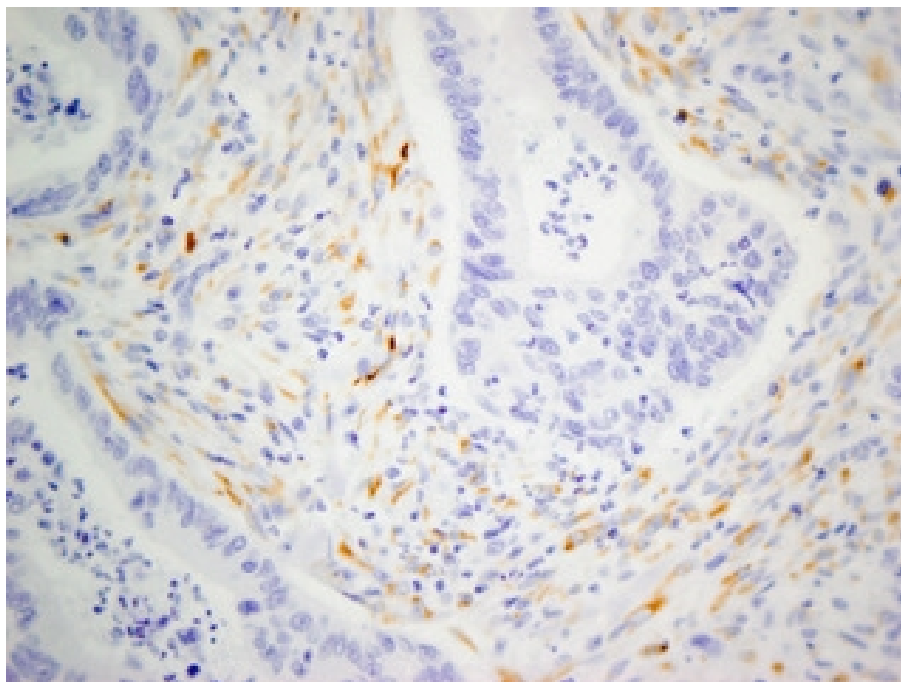


Figura 13. Imagen donde se observa la tinción con anti-proColX1 α 1. 400x.

Por otro lado, de la imagen teñida con Gomori se toma un mosaico de imágenes con un objetivo de 4x y un tamaño de imagen de 680 x 512 píxeles para cada fragmento del mosaico (Figura 14 y 15).

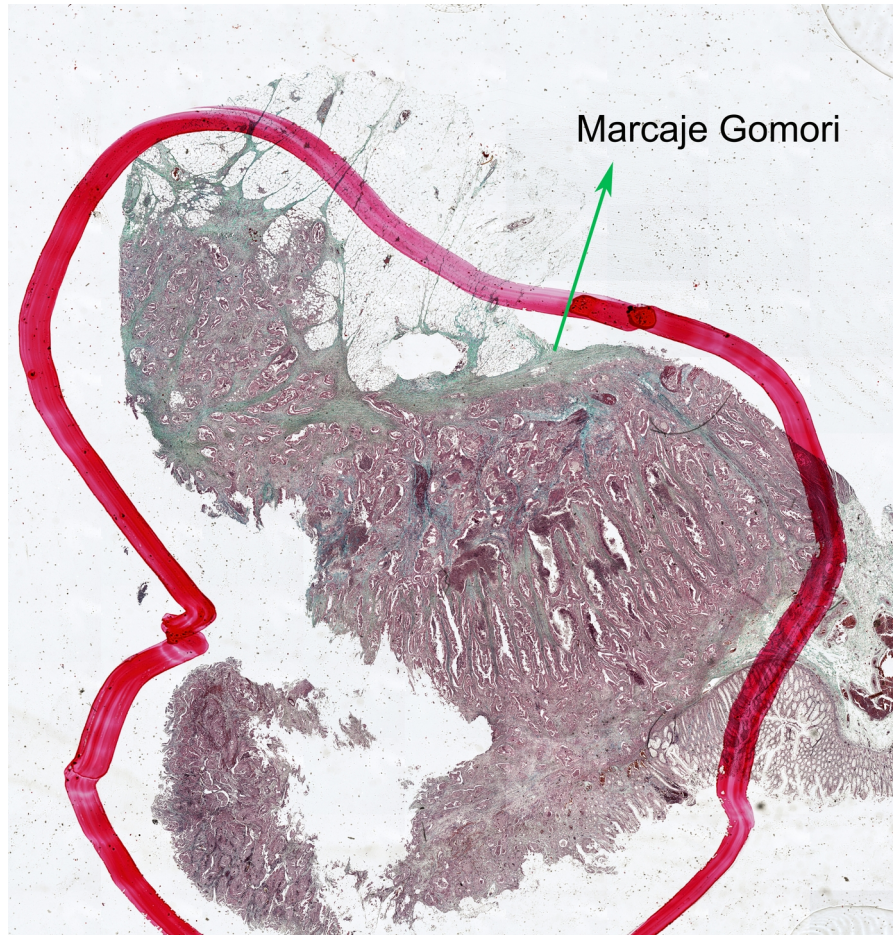


Figura 14. Mosaico de imágenes de una muestra teñida con Gomori. Mosaico formado por imágenes tomadas a 4x con un tamaño de imagen de 680x512 píxeles.

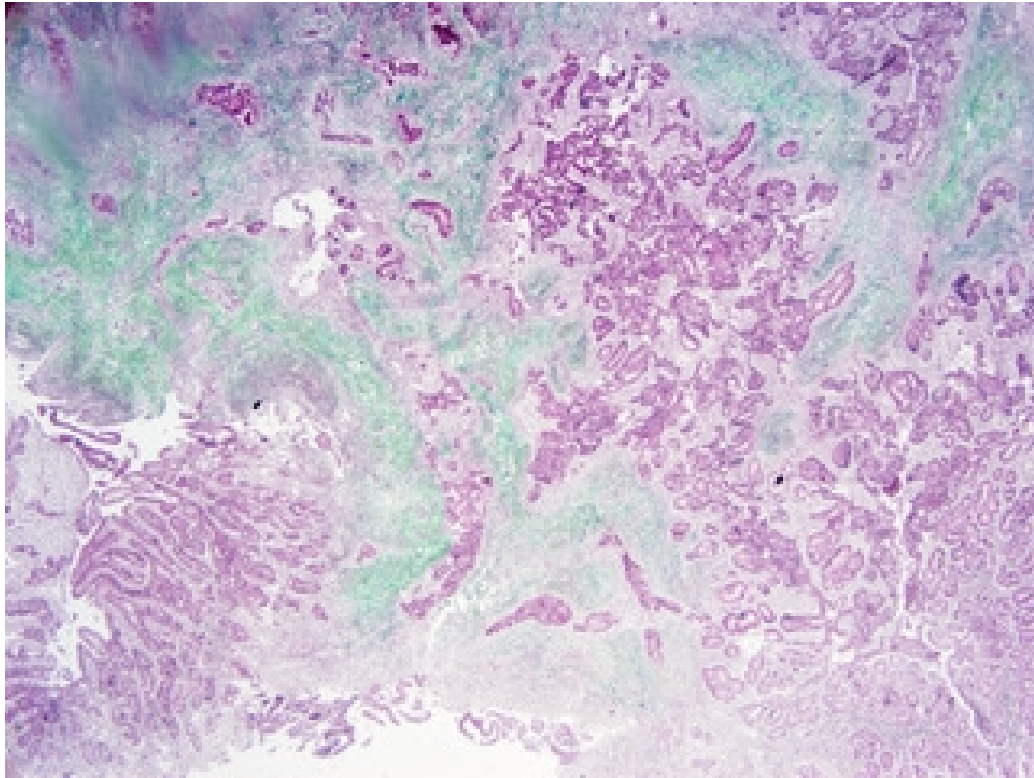


Figura 15. Imagen donde se observa la tinción verde de Gomori. 20x.

En ambos casos se trabaja sobre la zona de referencia previamente marcada sobre el portaobjetos, que corresponde a la zona de tejido tumoral.

Como software de tratamiento de imágenes utilizamos CAST2, que es un programa para estereología automatizada.

5.5.4. ANÁLISIS DE IMÁGENES

Una vez obtenidas las imágenes, éstas se analizaron con el programa Image J-FIJI, un software de libre distribución, junto con la macro Med_Colageno2.ijm. Para la detección de anti-proColXI α 1 se utilizó el plugin “Colour Deconvolution” realizado por Gabriel Landini (179) basado en el método descrito por Ruifrok, A.C. & Johnston, D.A. (180).

El programa mide el número de células y el área total de las zonas marcadas. También se cuantifica el número y el área de células no marcadas. Utilizando el mismo plugin de Color Deconvolution, ajustado para el marcaje del Gomori en verde, detecta el área de matriz colágena.

Obtuvimos los siguientes valores:

Nombre de la muestra: Nombre o clave del caso de estudio.

Ncampos: N° de imágenes por muestra analizadas para la medida del anti-proColXI α 1.

AreaTejido: Área de la muestra analizada para la medida del anti-proColXI α 1 (suma de las áreas de todas las imágenes analizadas).

Ncel-tot: N° de células totales en la muestra analizada (marcadas y no marcadas).

Areacel-tot: Área ocupada por las células (marcadas y no marcadas) en la muestra.

AreaCel-Colag: Área ocupada por las células con anti-proColXI α 1.

%Ncel-Colag: Porcentaje de número de células marcadas frente al n° total de células.

%Areacel-Colag: Porcentaje de área de células con anti-proColXI α 1 frente al área total de células.

%Areatejido-Colag: Porcentaje de área de células con anti-proColXI α 1 frente al área total de muestra analizada.

Area-refGomori: Área de tejido analizado para la medida de Gomori.

Area-Gomori: Área de tejido marcada con Gomori.

%Gomori: Porcentaje de tejido marcado con Gomori.

%Colag/Gomori: Relación entre el área de anti-proColXI α 1 y el área de Gomori (multiplicado por 100).

Todos los valores están expresados en micras (179,180).

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas se expresaron como medianas. Los grupos se compararon utilizando la prueba U de Mann-Whitney. La asociación entre variables cuantitativas se evaluó utilizando el coeficiente de regresión y la predicción de una variable a partir de otra a través de la ecuación de regresión. El crecimiento de los cultivos celulares se analizó utilizando ANOVA con corrección de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron utilizando los programas SPSS 15.0 (SPSS, Inc., Chicago IL) para Windows y MedCalvs12.

5.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los experimentos se realizaron según los estándares de la Unión Europea (2010/63 / UE) y España (RD 53/2013; ECC / 556/2015), y cumplieron con las pautas del Comité para el manejo y cuidado de animales de la Universidad de Oviedo, que proporcionó la aprobación total para esta investigación (PROAE 01/2016). Los pacientes firmaron formularios de consentimiento indicando su voluntad de participar en el estudio (Anexo 3). La extracción de muestras quirúrgicas fue aprobada por el Comité Ético del Hospital Universitario Central de Asturias (Proyecto n ° 42/12).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. CULTIVOS CELULARES

6.1.1. MORFOLOGÍA CELULAR

Como se describió en material y métodos, se cultivaron NF y CAFs obtenidos de muestras quirúrgicas de resecciones de cáncer de colon.

Los fibroblastos se cultivaron y se sometieron a las tinciones descritas en material y métodos para seleccionarlos entre las células tumorales (Figura 16). Este tipo de cultivos normalmente se contamina y la eficiencia de cultivo es relativamente baja.

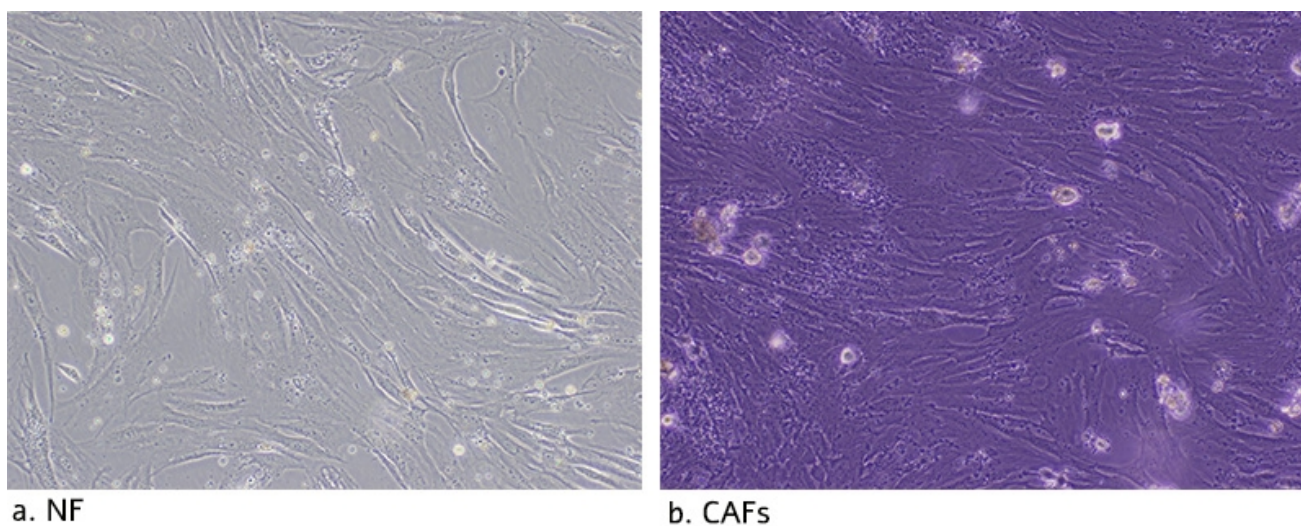


Figura 16. Primer pase de cultivo donde observamos los fibroblastos mezclados con otros tipos celulares. **a.** NF; **b.** CAFs.

Lo primero que se estudió fue la morfología de las células obtenidas tanto en la zona normal como en la peritumoral, observando en ambos casos una morfología de fibroblastos, sin diferencias entre las dos zonas (Figura 17, a y b). Para confirmar que se trataba de fibroblastos, se realizó una tinción con vimentina, siendo positiva en ambos casos (Figura 17, c y d).

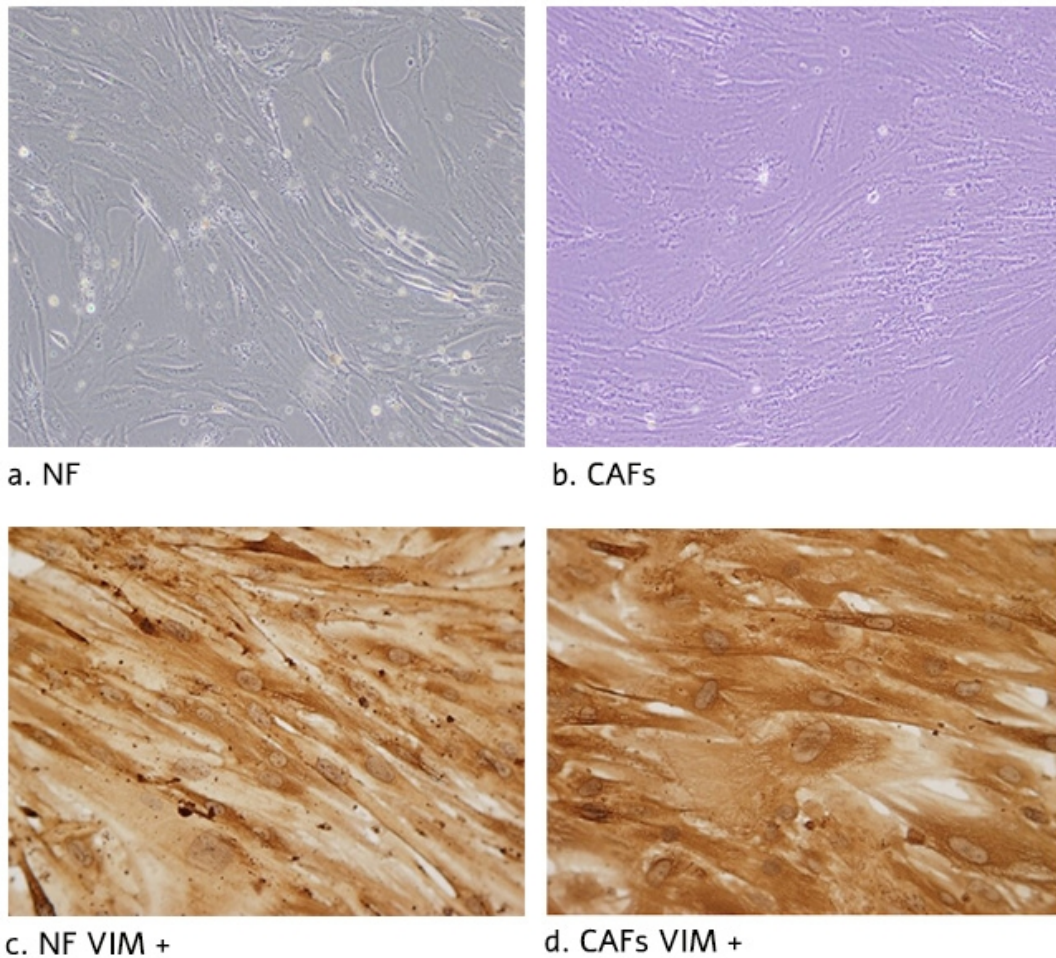


Figura 17. **a.** Fibroblastos obtenidos de zona normal; **b.** Fibroblastos obtenidos de zona peritumoral; **c.** Fibroblastos de zona normal teñidos con vimentina; **d.** Fibroblastos de zona peritumoral teñidos con vimentina.

Inmunofluorescencia de células estromales cultivadas y microscopía confocal

En pases más avanzados se realizaron las tinciones explicadas en material y métodos. El anti-proColXI α 1 es un marcador específico de los CAFs, la α SMA y la VIM tiñen los CAFs así como los fibroblastos activados, y la CK19 es un marcador epitelial.

Los CAFs y NF cultivados presentaron una tinción proColXI α 1 + / VIM +, como podemos ver en la Figura 18.

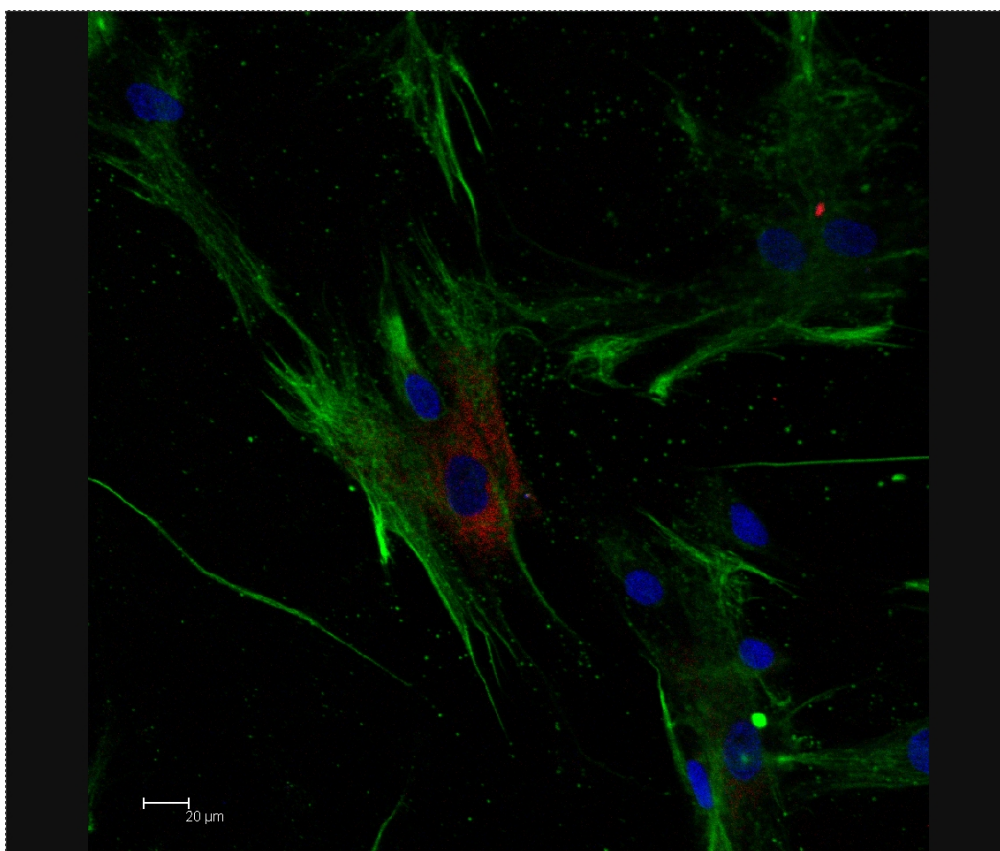


Figura 18. Microscopía confocal de CAFs cultivados. Tinción de doble fluorescencia. Células proColXI α 1 + / VIM +. Rojo: proColXI α 1; verde: VIM; azul: núcleos celulares. Escala 20 μ m (630x).

Así mismo se observó marcaje proColXI α 1 + / alphaSMA + en estas células (Figura 19).

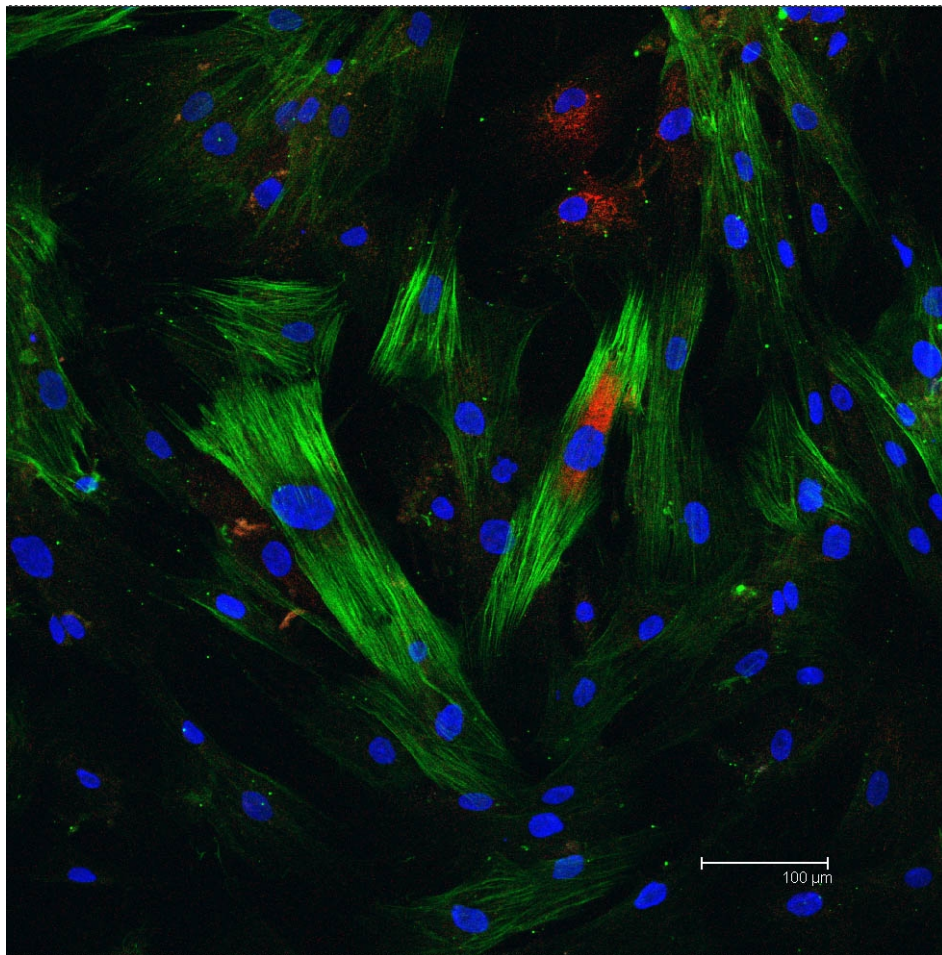


Figura 19. Microscopía confocal de CAFs cultivados. Tinción de doble fluorescencia. Células proColXI α 1 + / alphaSMA +. Rojo: proColXI α 1; verde: α SMA; azul: núcleos celulares. Escala 100 μ m (630x).

Un pequeño porcentaje presentaron proColXI α 1 + / CK19 + , que corresponde a un fenotipo epitelial. Podemos ver un ejemplo en la Figura 20.

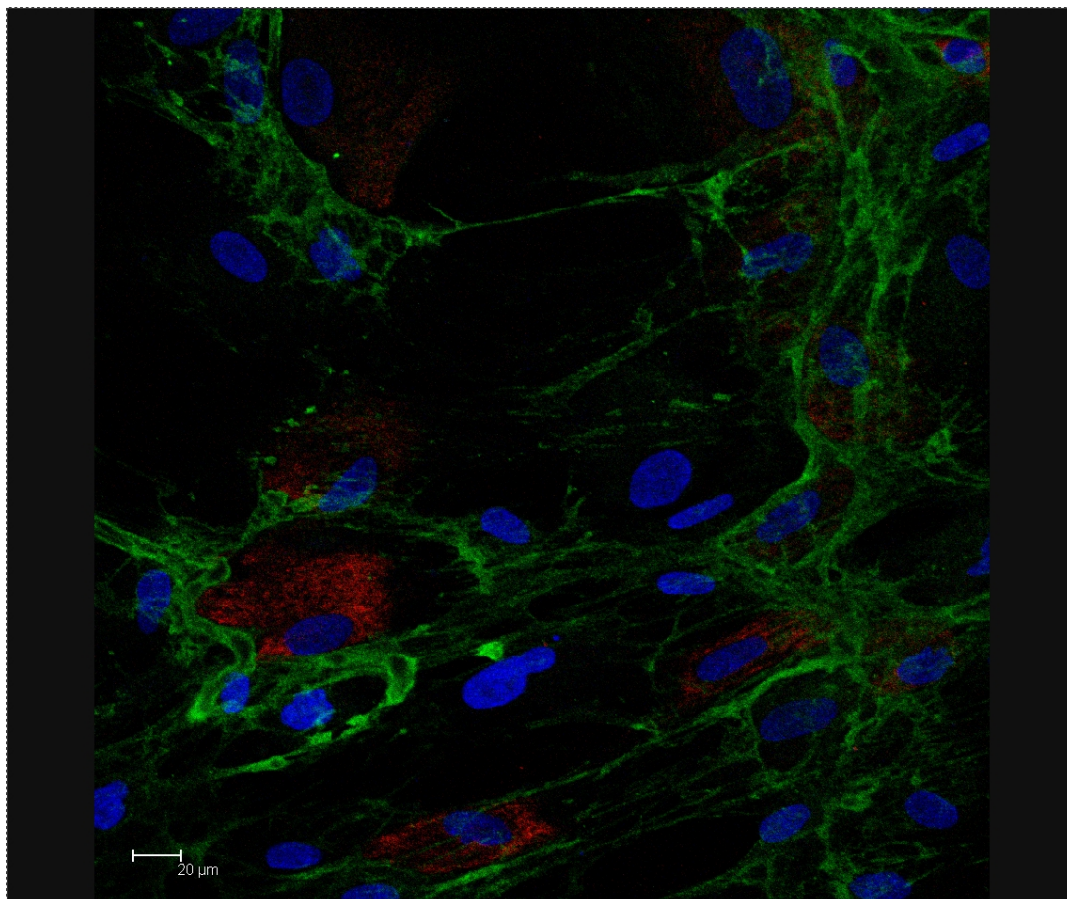


Figura 20. Microscopía confocal de CAFs cultivados. Tinción de doble fluorescencia. Células proColXI α 1 + / CK19 + . Rojo: proColXI α 1; verde: CK19; azul: núcleos celulares. Escala 20 μ m (630x).

Los CAFs y NF cultivados fueron proColXI α 1 + / VIM +, proColXI α 1+ / alphaSMA + y proColXI α 1 + / CK19 + en diferentes proporciones, existiendo varias poblaciones donde se da el doble marcaje, mientras que hay células que solo presentan uno. No se observaron diferencias significativas entre CAFs y NF.

6.1.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Cultivo de fibroblastos

En los cultivos de fibroblastos se observó que las células normales tenían un crecimiento más lento que las peritumorales (Figura 21).

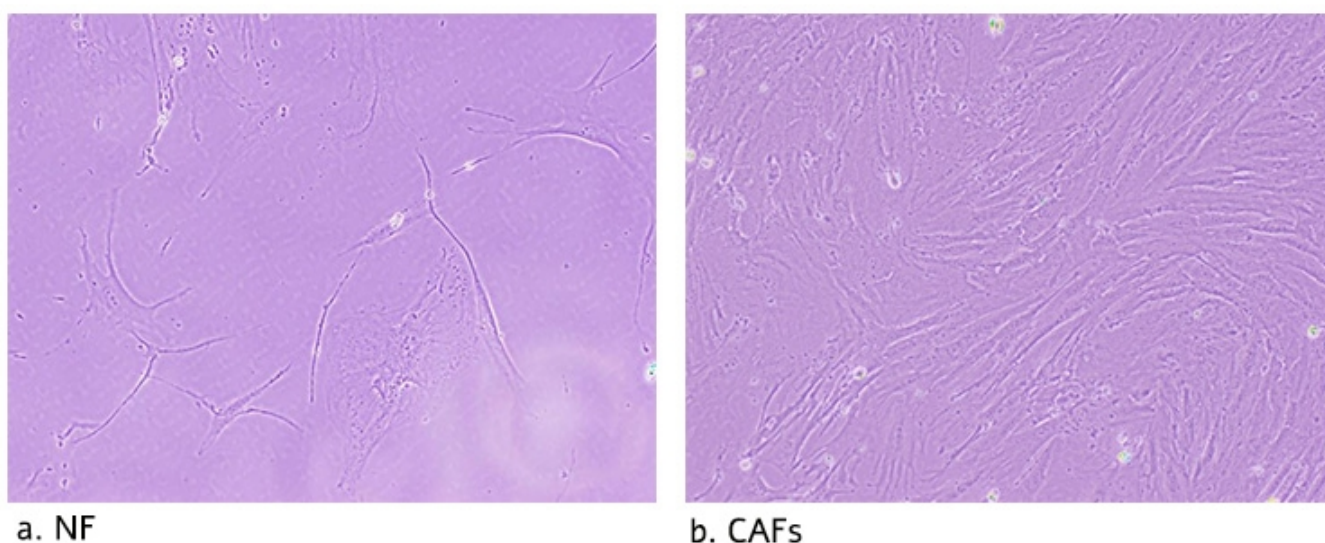


Figura 21. Imagen de los fibroblastos a los 4 días de cultivo. **a.** NF; **b.** CAFs.

Con el objetivo de comprobar si el crecimiento de ambos tipos celulares era uniforme, se realizó un estudio de cinética de crecimiento. Se realizaron determinaciones duplicadas de cada paciente, se sembró el mismo número de células, en este caso 10.000, en cada pocillo, y se contaron las células cada 2 días. Analizamos los datos de crecimiento de 12 días. Se comparó la proliferación de NF y CAFs. Se observó que los fibroblastos obtenidos de la zona peritumoral experimentaban una mayor proliferación, siendo la curva de crecimiento de los CAFs significativamente mayor que la de los NF ($p < 0.05$) (Figura 22).

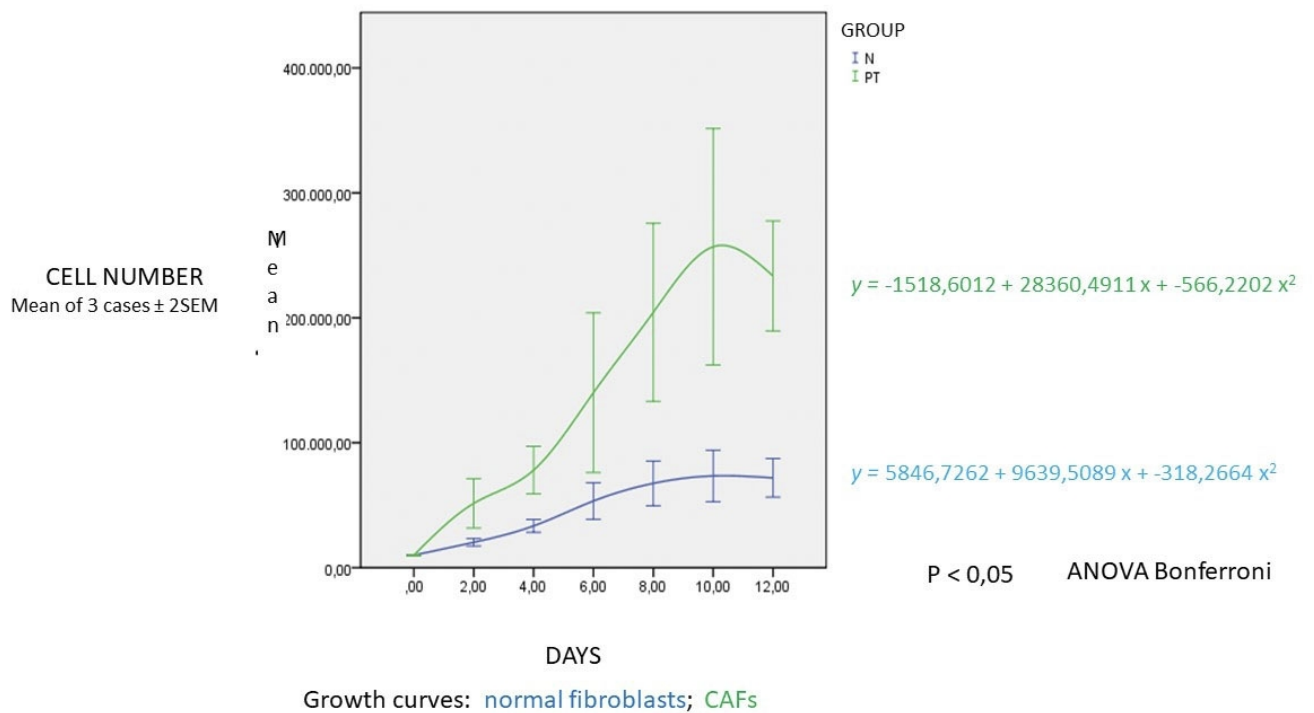


Figura 22. Curvas de crecimiento de fibroblastos. Azul, fibroblastos normales; verde, CAFs. Cultivos obtenidos de tres pacientes con adenocarcinoma de colon. Media de tres pacientes con determinaciones duplicadas.

Como se puede ver la gráfica la proliferación de los CAFs es estadísticamente mayor que la de los NF.

6.2. IDENTIFICACIÓN DE CAFs HUMANOS EN LOS XENOTRASPLANTES

Como se explicó anteriormente, se marcaron CAFs con colorante celular de fluorescencia roja PKH26 y se inyectaron en el páncreas de ratones. Tras 7 días se sacrificaron y las muestras de tumor se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizaron secciones que se incubaron con mAb anti-proColXI α . Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Para documentar la presencia y el origen humano de los CAFs, se analizaron varias secciones por ratón mediante microscopía confocal. Las células positivas para PKH26 presentaron fluorescencia roja y las células positivas para pro-ColXI α 1 presentaron fluorescencia verde.

La coexpresión de PKH-26 y proColXI α 1 humano en el área peritumoral de los carcinomas desarrollados en xenotrasplantes heterotópicos de ratón (Figura 23) demuestra que los CAFs trasplantados se mantienen cuando crecen los injertos.

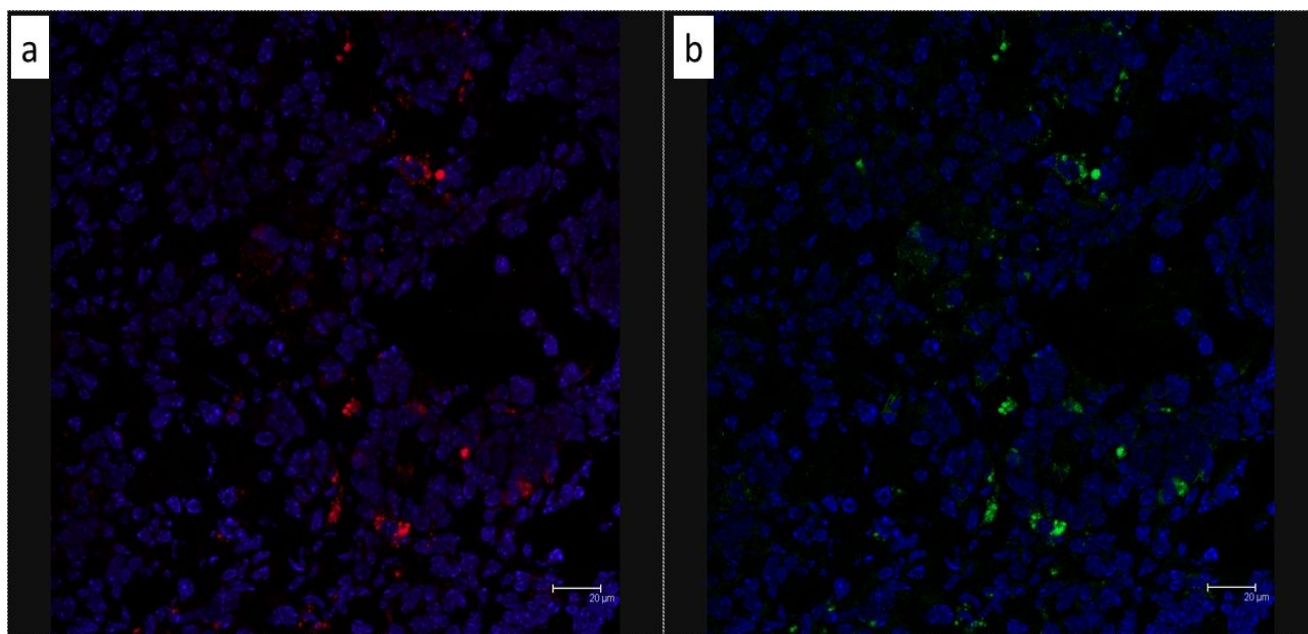


Figura 23. Coexpresión de **a.** PKH-26 (rojo) y **b.** pro-ColXI α 1 humano (verde) en CAFs, área peritumoral de carcinoma en xenoinjertos heterotópicos de ratón. Núcleos celulares tumorales contrateñidos de azul con DAPI. Escala 20 μ m (630x).

Con esto se demuestra que las células trasplantadas permanecen tras la realización del trasplante. Con el paso de los días van perdiendo fluorescencia porque al dividirse pierden parte del marcaje de la membrana. Las células de ratón no son positivas para proColXI α 1.

6.3. XENOTRASPLANTE HETEROTÓPICO DE CÉLULAS HT-29 EN LA CABEZA DEL PÁNCREAS

Para este modelo se utilizaron células de la línea HT-29, CAFs y NF obtenidos de muestras frescas de cáncer de colon humano, realizando cuatro grupos experimentales. El volumen tumoral se calculó en mm³ con la fórmula *eje mayor* x (*eje menor*)² x 0,52. Se utilizaron ratones SCID machos de 6 semanas. Los preparados celulares se inyectaron en la cabeza pancreática de los animales, que fueron sacrificados un mes después.

Se hicieron los siguientes grupos experimentales con los resultados que se detallan a continuación:

- I. 150.000 CAFs en 12 ratones: no se desarrolló tumor en ningún animal.
- II. 1,5 millones de células HT-29 en 7 ratones, como control. De estos fueron éxitos 5 en los primeros días tras el experimento. Se analizó el crecimiento tumoral en 2 ratones. La alta mortalidad podría ser atribuída a que estos trasplantes se realizaron cuando teníamos menos experiencia en esta técnica. Los dos ratones supervivientes presentaron carcinomas pobremente diferenciados en el páncreas, infiltrando el estómago por proximidad y con metástasis hepáticas. También se desarrollaron metástasis pulmonares en uno de los ratones en el que también se encontró un foco tumoral en el intestino delgado (Figura 24, Tabla S2 en Anexo 4).

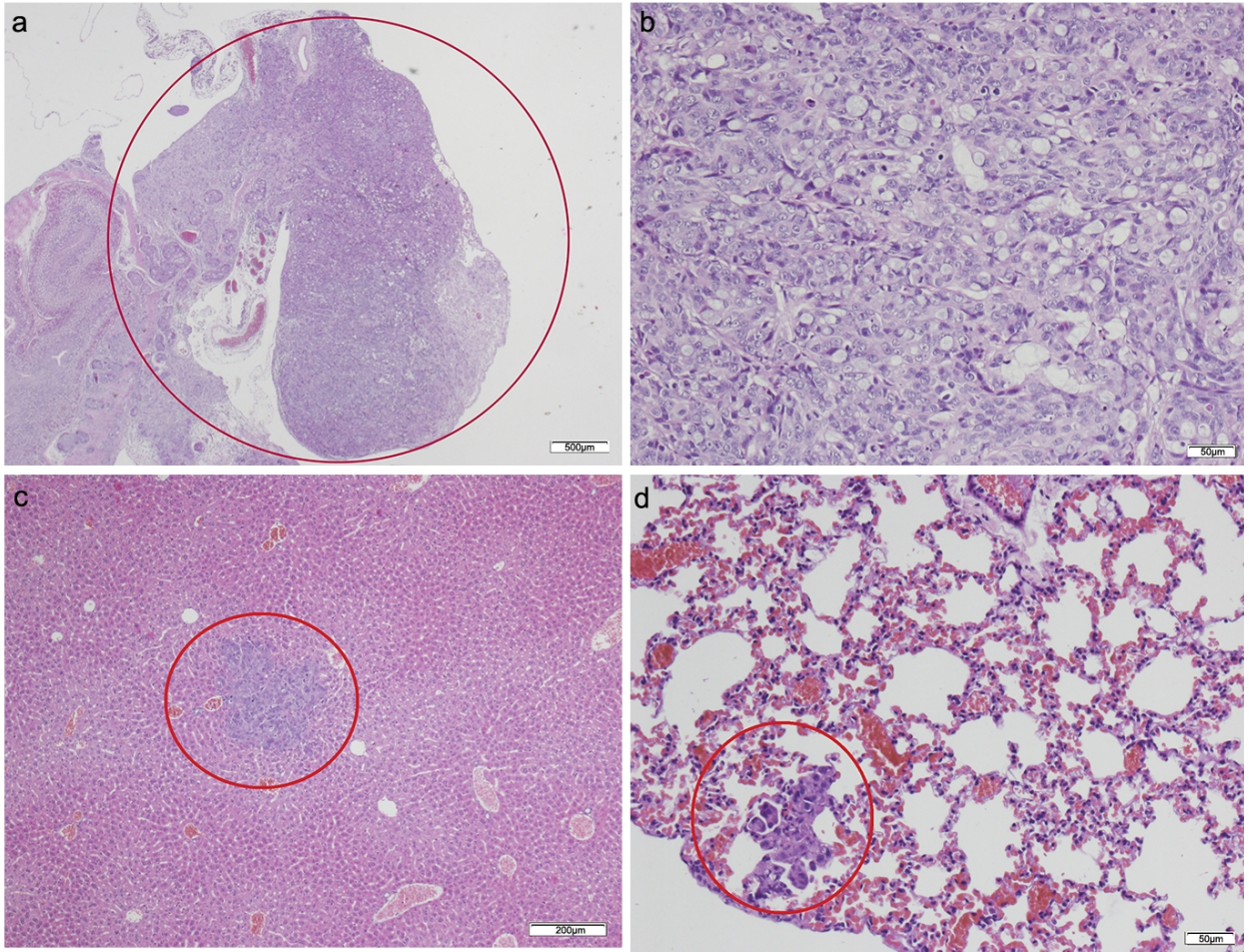


Figura 24. Xenotrasplantes HT-29. **a.** Tumor de colon desarrollado en páncreas (H-E 1,25x). **Círculo rojo:** tamaño máximo del tumor. **b.** Imagen histológica de adenocarcinoma poco diferenciado, (H-E 10x). **c.** Metástasis hepática rodeada con un círculo rojo (H-E 4x). **d.** Metástasis pulmonar rodeada con un círculo rojo (H-E 4x). Barra de escala: figura a: 500 μm ; figuras b y d: 50 μm ; figura c: 200 μm .

III. 1,5 millones de células HT-29 + 150.000 NF en 5 ratones. De estos uno murió; los cuatro restantes desarrollaron un tumor con metástasis hepáticas y uno tenía múltiples metástasis pulmonares, esplénicas, renales e implantes en intestino grueso (Figura 25 y 26, Tabla S3 en Anexo 4). Todos mostraron focos tumorales ocasionales en el intestino delgado.

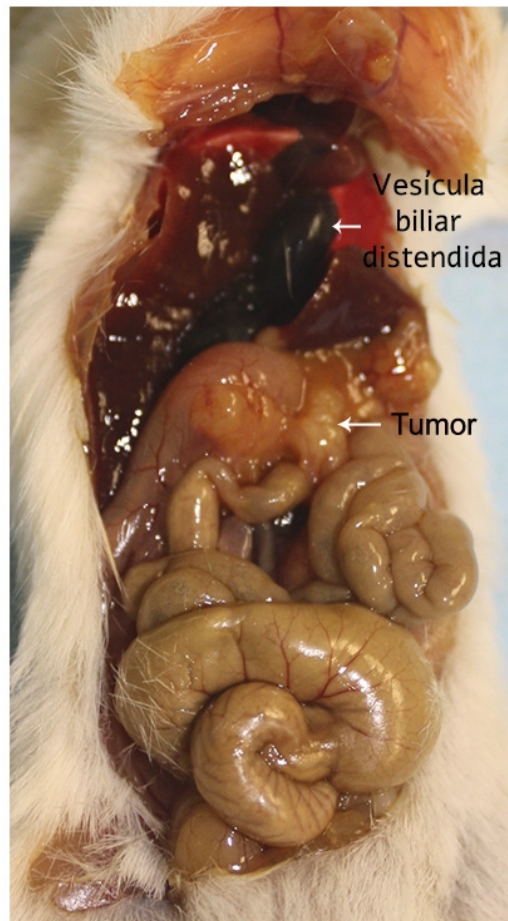


Figura 25. Xenotrasplantes HT-29 + NF. Imagen de la necropsia de un ratón. Gran tumor en páncreas que condiciona distensión de la vesícula biliar (signo de Courvoisier-Terrier) e infiltración gástrica.

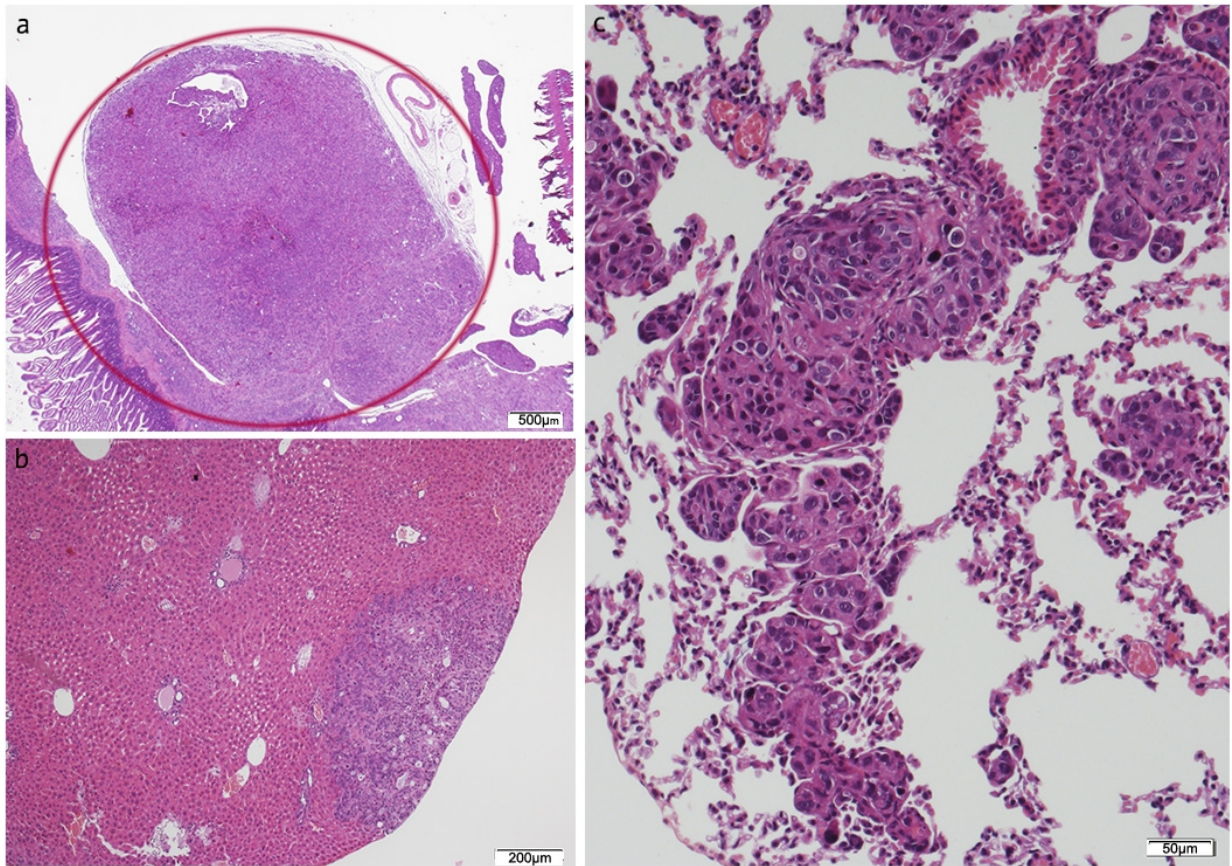


Figura 26. Xenotrasplantes HT-29 + NF. **a.** Tumor de colon desarrollado en tejido pancreático. Círculo rojo: tamaño máximo del tumor (H-E 1,25x). **b.** Metástasis hepática (H-E, 4x). **c.** Metástasis pulmonar (H-E, 4x). Barra de escala: figura a: 500µm; figura b: 200µm; figura c: 50µm.

IV. 1,5 millones de células HT-29 + 150.000 CAFs en 10 ratones. Fueron éxitos 2 ratones y llegaron al final del experimento 8 ratones. Todos los casos con tumor en el páncreas desarrollaron metástasis hepáticas y en más de la mitad se identificaron metástasis pulmonares. Un animal presentó metástasis en el bazo, tres en el intestino delgado y dos en el peritoneo con múltiples focos de invasión linfovascular (Figura 27, 28 y 29; Tabla S4 en Anexo 4).

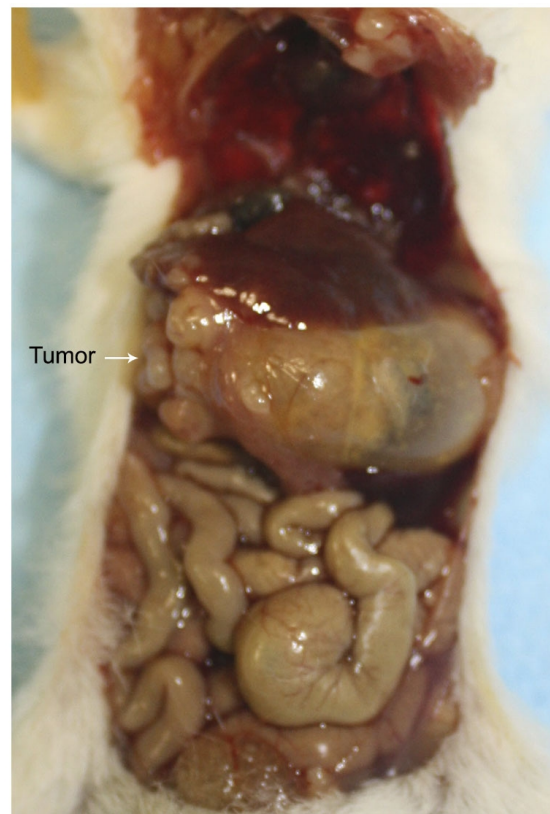


Figura 27. Xenotrasplantes HT-29 + CAFs. Imagen de la necropsia de un ratón. Gran tumor en páncreas que condiciona infiltración y distensión gástrica secundaria e infiltración hepática.

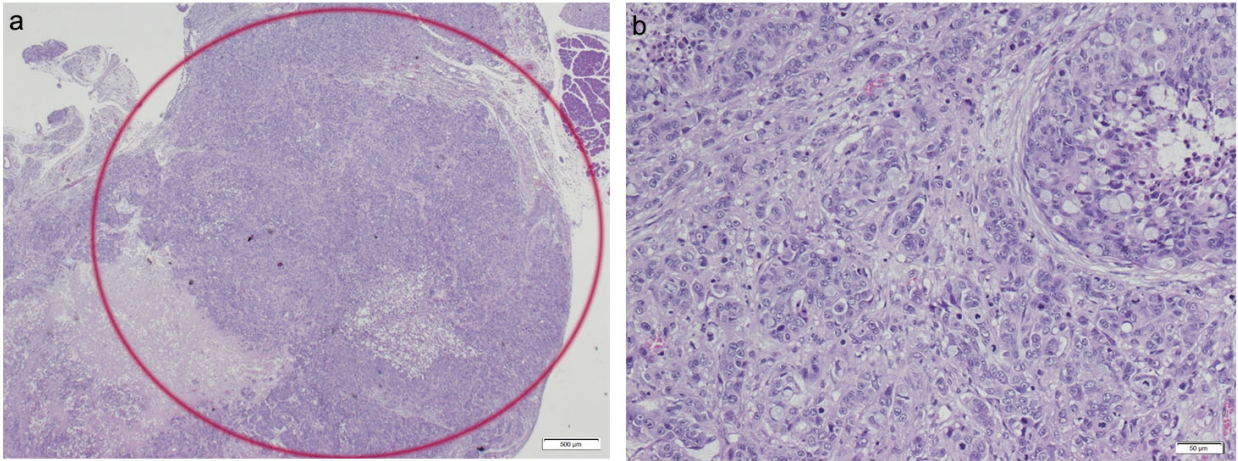


Figura 28. Xenotrasplantes HT-29 + CAFs. **a.** Tumor de colon desarrollado en tejido pancreático (H-E 1,25x). Círculo rojo: tamaño máximo del tumor. **b.** Imagen histológica de adenocarcinoma de colon poco diferenciado (H-E 10x). Barra de escala: figura a: 500 μ m; figura b: 50 μ m.

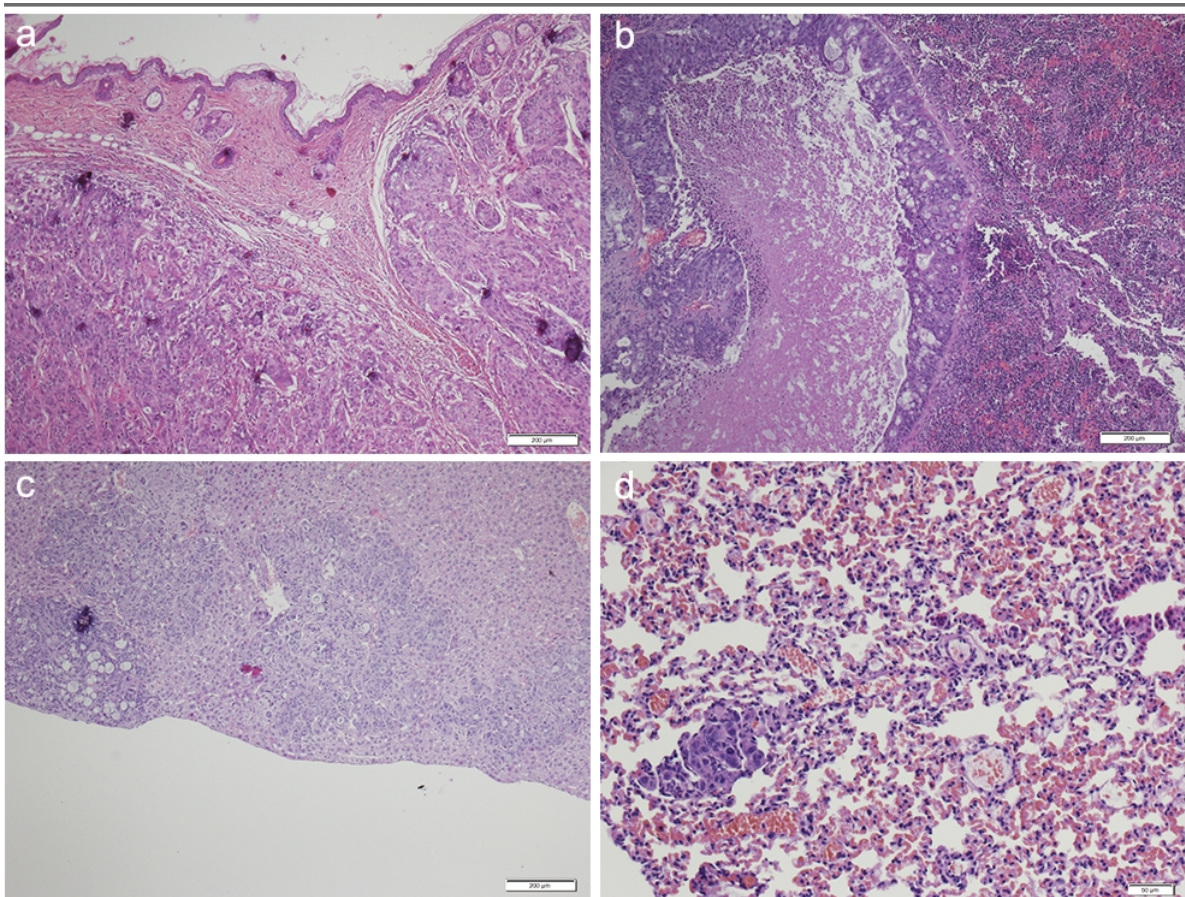


Figura 29. Xenotrasplantes HT-29 + CAFs. Nidos de células epiteliales metastásicas situadas en: **a.** Piel; **b.** Bazo; **c.** Hígado; **d.** Pulmón. (H-E, 4x). Barra de escala: figura a, b, c: 200 μ m; figure d: 50 μ m.

En la siguiente tabla se resumen los resultados de los xenotrasplantes (Tabla 9).

	I. CAFs	II. HT-29	III. HT-29 + NF	IV. HT-29 + CAFs
Incidencia tumoral (%)	0 (0/12)	100 (2/2)	100 (4/4)	87,5 (7/8)
Volumen tumoral medio (mm³)	0	47,64 (3,67-91,61)	85,27 (8-239,57)	176,17 (0-563,16)
Metástasis hepáticas (%)	0	100	100	87,5
Metástasis pulmonares (%)	0	50	25	50

Tabla 9. Resumen de los resultados de los xenotrasplantes.

La pérdida de animales del grupo HT-29 imposibilitó compararlos directamente con los animales que recibieron NF y CAFs, si bien en otros experimentos se comprobó que el desarrollo de tumor y metástasis era inferior que cuando se asociaba a CAFs (181–183). Observamos que los volúmenes tumorales de los grupos que recibieron HT-29 y los HT-29 + NF eran similares, por lo que decidimos establecer un grupo único con los animales HT-29 y HT-29 + NF, asumiendo que los NF no influirían tanto en el crecimiento tumoral como los CAFs (Tabla 10).

El volumen del tumor en el páncreas fue significativamente mayor en el grupo HT-29 + CAFs que en el grupo combinado que recibió HT-29 con / sin NF. Las metástasis hepáticas también presentaron una mayor carga tumoral en el grupo en el que se asoció CAFs, pero sin alcanzar significación estadística.

	I. CAFs	II. HT-29, <i>HT-29NF*</i>	III. HT-29CAFs	P III vs II
Nº animales	12	12 (7+5*)	10	
Éxitus	0	6 (5+1*)	2	
Incidencia tumoral (%)	0	100 (6/6)	87,5 (7/8)	NS
Volumen tumoral (mm ³)	-	3,7; 91,6 8; 28,2; 65,3; 239,6*	76,9; 93,7; 143,9; 154,8; 169,9; 207; 563,6	
Volumen tumoral medio(mm ³)	-	46,7 (3,7-239,6)	154,8 (76,9-56,2)	0,04
Metástasis hepáticas (%)	-	100 (6/6)	100 (7/7)	
Nº nódulos hepáticos		1; 6 2; 3; 4; 5*	6; 9; 9; 10; 14; 14	
Media de nódulos hepáticos (mínimo – máximo)		3,5 (1-6)	6 (2-11)	0,12
Carga tumoral media (mínimo – máximo)		6,5 (1-12)	10 (6-15)	0,08
Metástasis pulmonares (%)	-	33 (2/6)	57 (4/7)	NS
Puntuación de agresividad (mínimo – máximo)		5 (3-8)	7 (5-8)	0,06

Tabla 10. Resumen de los resultados de los xenotrasplantes considerando los xenotrasplantes de HT-29 y los de *HT-29 + NF**.

En todos los casos en los que se identificó tumor, histológicamente fue una lesión epitelial maligna (carcinoma), en su mayoría pobremente diferenciada. Citológicamente, todos estos tumores mostraron pleomorfismo celular y nuclear, con un aumento en la relación núcleo-citoplasma, membranas nucleares irregulares y varios nucleolos. Algunos presentaban invasión vascular e infiltración del estómago por proximidad.

La media del número de nódulos hepáticos, la carga tumoral, las metástasis pulmonares y la puntuación de agresividad tumoral fueron mayores en el grupo III (HT-

29 + CAFs) frente al grupo II (HT-29 y HT-29 + NF), aunque sin ser significativos, excepto en el caso del volumen tumoral, que fue significativamente mayor en el grupo III (154.8 (76.9-563.2) mm³) vs grupo II (46.7 (3.7-239.6) mm³), P = 0.04. Se observó una relación entre el tamaño del tumor desarrollado en el páncreas y la carga tumoral metastásica en el hígado ($y = 0.321 + 4.483 \log(x)$, $r = 0.69$, $P = 0.001$) y la puntuación en la escala de gravedad ($y = 2.231 + 2.008 \log(x)$, $r = 0.79$, $P < 0.001$) (Figura 30) (184).

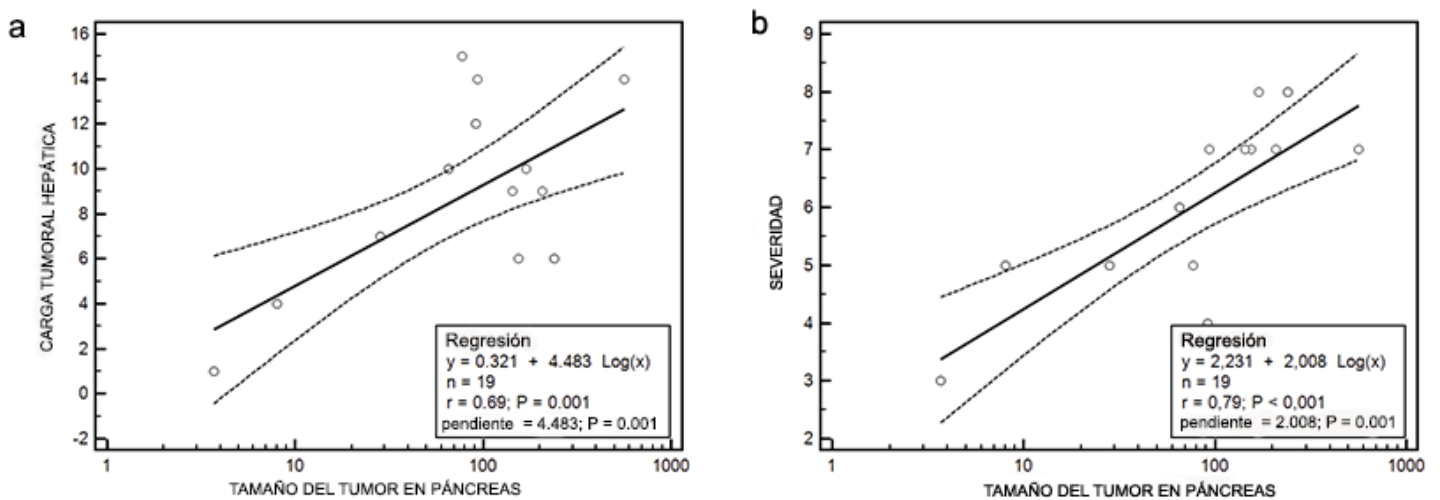


Figura 30. Relación entre el tumor desarrollado en el páncreas y la carga tumoral hepática o la escala de severidad. Ecuaciones de regresión. **a.** Tamaño del tumor en páncreas – carga tumoral hepática; **b.** Tamaño del tumor en páncreas – escala de severidad.

6.4. CUANTIFICACIÓN DE CoXI α 1 EN MUESTRAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO

Se analizaron los casos de 189 pacientes intervenidos de cáncer de colon, con una edad media de 72 años. El 46,3% de los pacientes fueron mujeres y el 53,7% hombres (Figura 31).

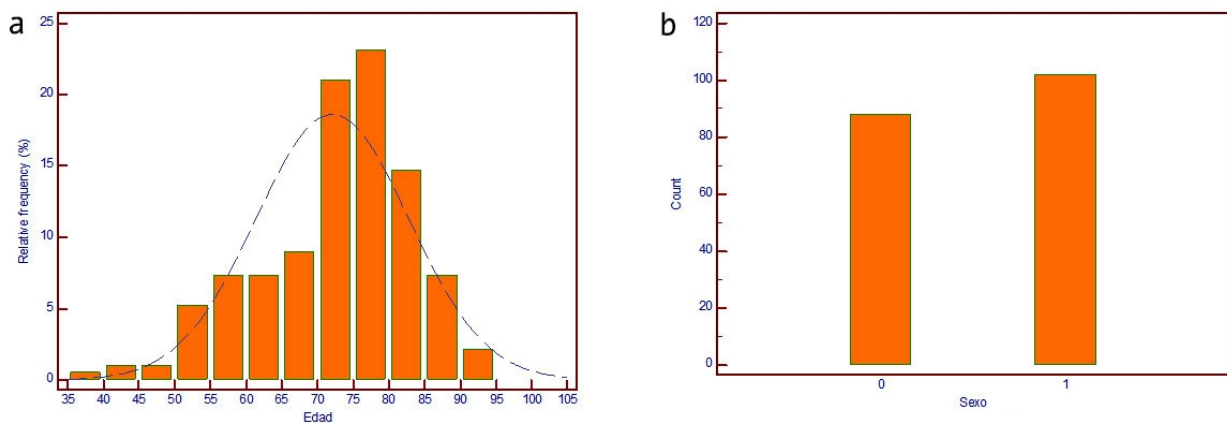


Figura 31. a. Distribución por edad (años); b. Distribución por sexo: **0** mujeres, **1** hombres.

En cuanto a la distribución por estadios, el 13% de los casos correspondió al estadio I, el 40% al estadio II, el 29% al estadio III y el 18% al estadio IV (Figura 32).

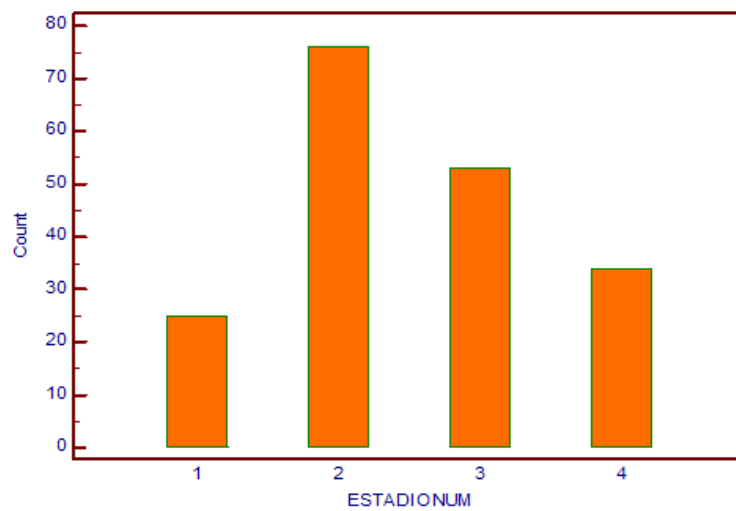


Figura 32. Distribución por estadios del cáncer colon.

Se realizó una media de seguimiento de 64 meses, encontrando recidiva en un 32% de los casos, que por estadios fue de 0 en el estadio I, 21 en el estadio II, 44 en el estadio III y 86 en el estadio IV ($P < 0,0001$) (Figura 33).

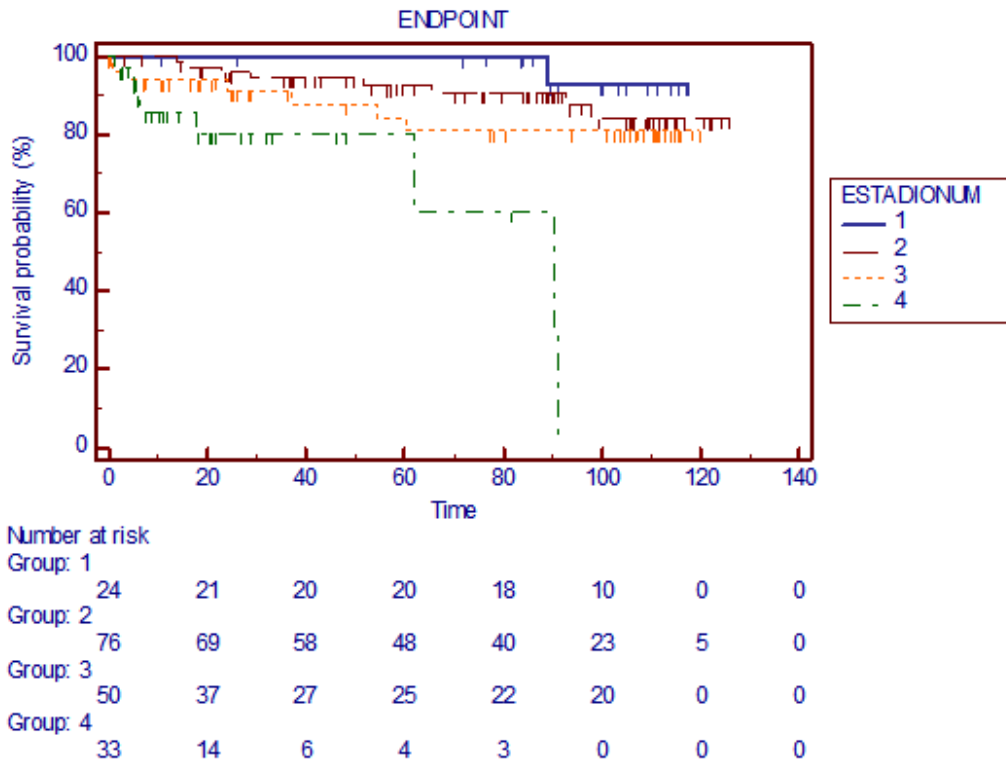


Figura 33. Supervivencia por estadios (S_5) (Logrank test).

La supervivencia en pacientes sin metástasis en ganglios (N-) fue del 94%, y en pacientes con metástasis ganglionares (N+) del 64% (P<0.001).

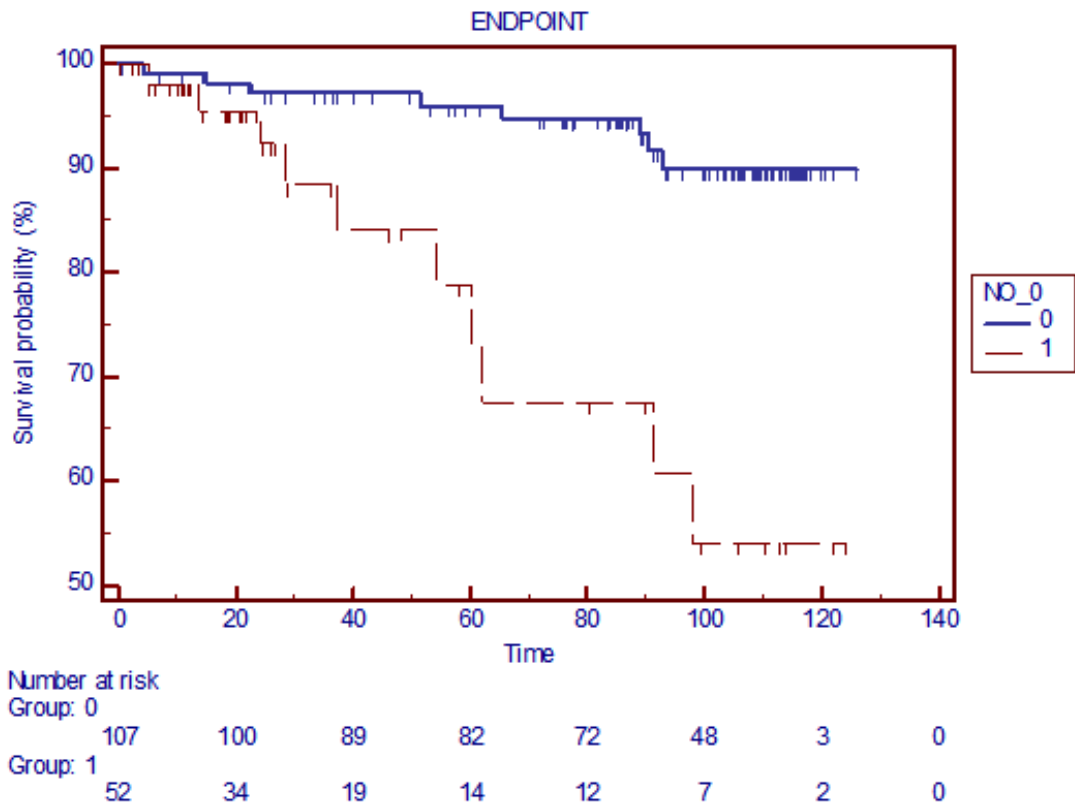


Figura 34. Supervivencia N- vs N+ (S₅) (Logrank test).

Analizamos aproximadamente 5300 imágenes, con un volumen de 45 gigabytes. En cuanto a las imágenes teñidas con **anti-proColXI α 1**, que marca los CAFs, se obtuvieron al azar por medio de un microscopio Olympus BX61, una media de 27 campos por muestra (Figura 35).

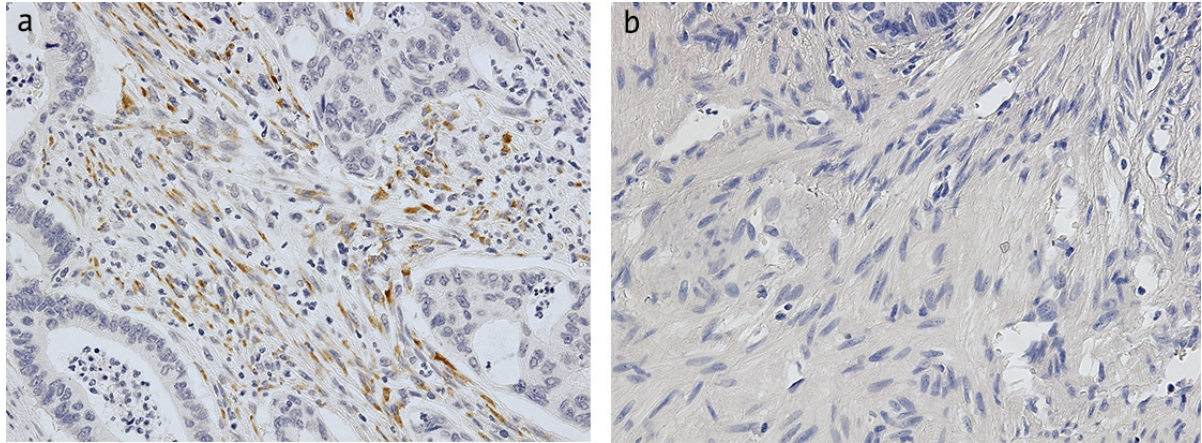


Figura 35. Ejemplos de imágenes de muestras marcadas con anti-proColXI α 1. **a.** Imagen con marcaje abundante, 20x; **b.** Imagen sin marcaje, 20x.

Hemos visto que el número total de células de la matriz estromal es mayor en estadios iniciales ($P < 0.05$) (Figura 36).

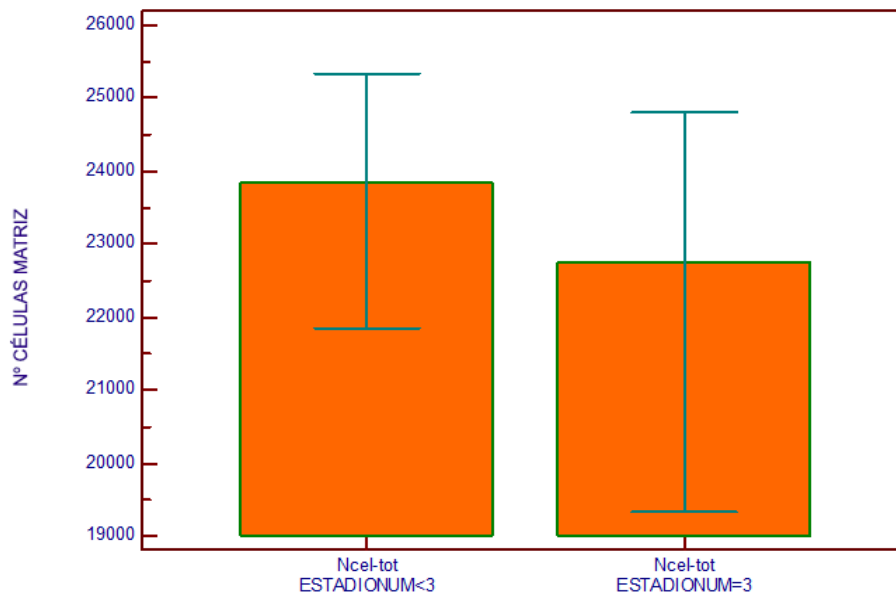


Figura 36. Número total de células de la matriz estromal por estadio.

También el número de CAFs es mayor en estadios iniciales ($P < 0.05$) (Figura 37).

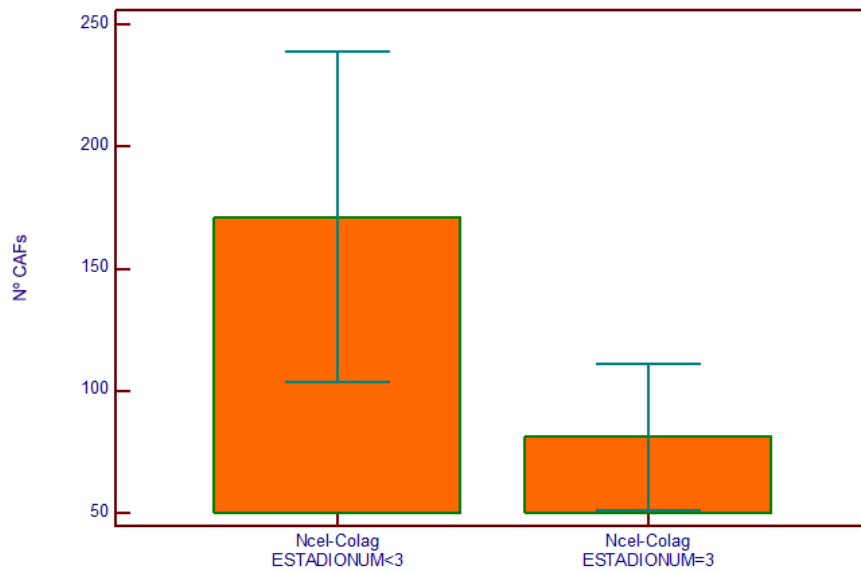


Figura 37. Número de CAFs por estadio.

El área teñida con anti-proColXI α 1, que corresponde al área que ocupan los CAFs, también es mayor en estadios iniciales ($P < 0.05$) (Figura 38).

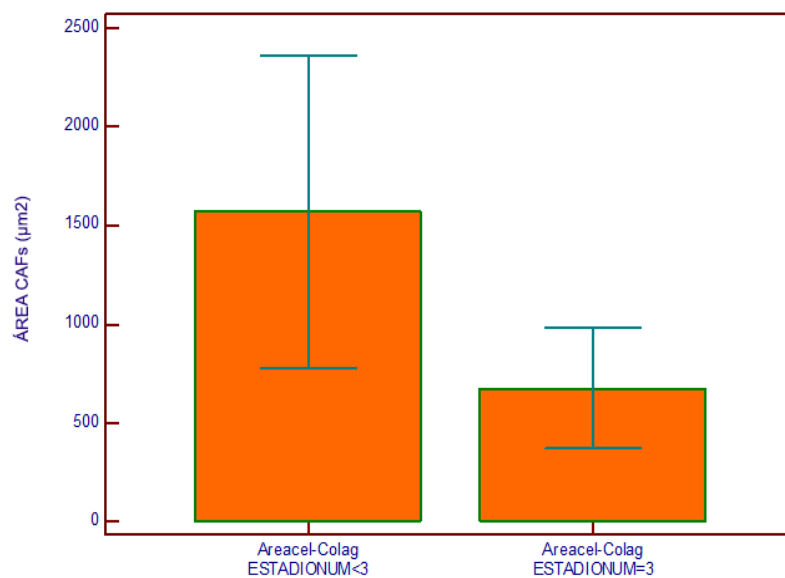


Figura 38. Área CAFs por estadio I,II vs III.

El otro tipo de imágenes que hemos analizado son las obtenidas de las muestras marcadas con **Gomori**, que tiñe la matriz extracelular (Figura 39). En este caso se realizó un mosaico de imágenes, como hemos explicado anteriormente.

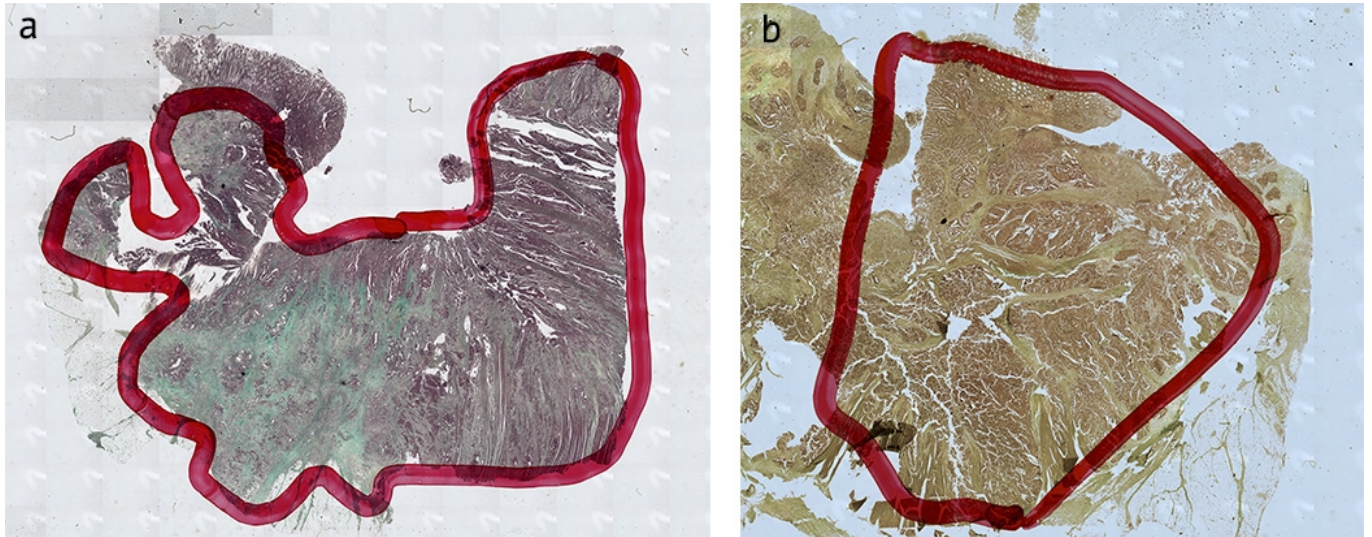


Figura 39. Ejemplos de imágenes de muestras teñidas con Gomori. **a:** imagen con tinción abundante; **b:** imagen con tinción escasa.

El análisis del área de la matriz extracelular teñida con Gomori, por estadios, mostró un valor menor en estadios iniciales ($P < 0.01$) (Figura 40).

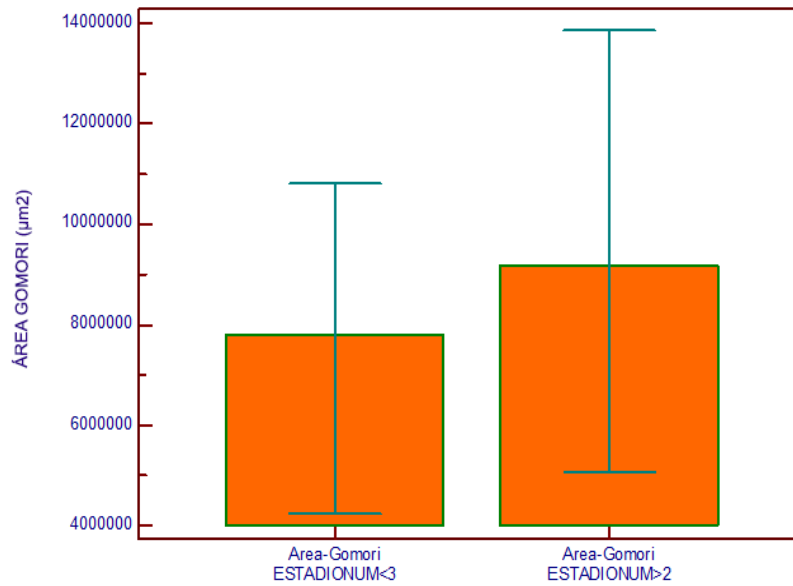


Figura 40. Área Gomori por estadio.

Comparamos el área de Gomori en casos sin y con metástasis ganglionares (N- y N+), encontrando que el área de la matriz extracelular fue menor en los casos sin metástasis en ganglios ($P < 0.05$) (Figura 41).

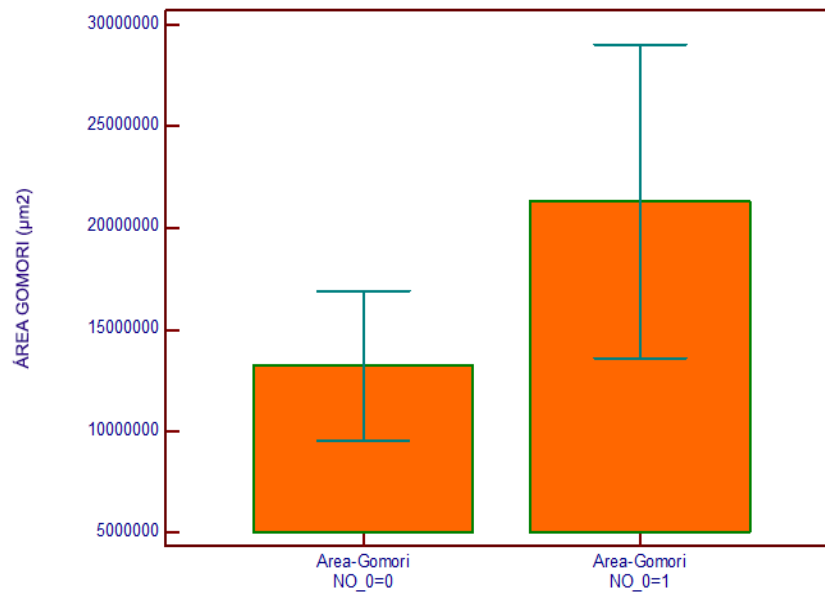


Figura 41. Área Gomori N- vs N+.

Así mismo, encontramos que el área de la matriz extracelular fue menor en los casos sin metástasis a distancia (M0) en comparación con los casos con metástasis a distancia (M1) ($P < 0.05$) (Figura 42).

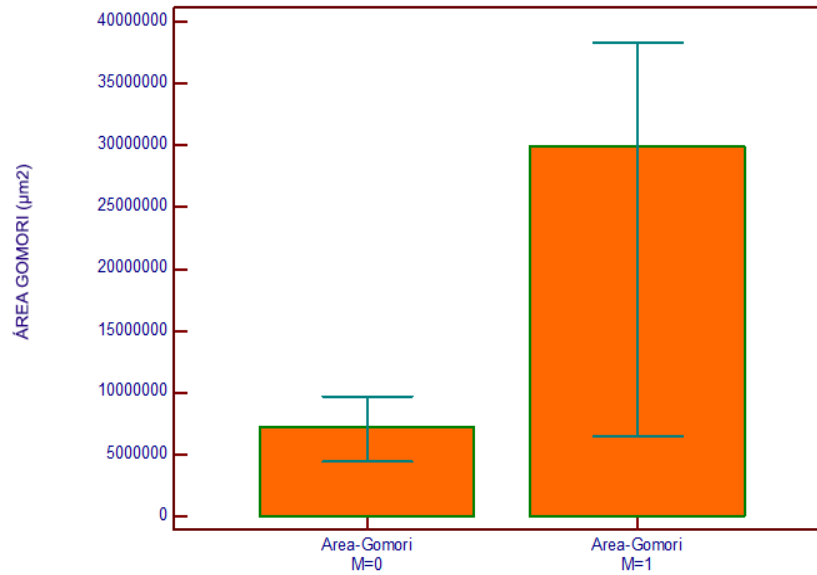


Figura 42 Área Gomori M- vs M+.

El número total de células del estroma, así como el de CAFs y su área, estudiados mediante la tinción con proColXI α 1, fueron mayores en estadios iniciales. Sin embargo, el área de la matriz extracelular (tinción de Gomori) resultó mayor en estadios avanzados.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de nuestro trabajo ha sido analizar el papel del estroma peritumoral en el cáncer de colon, especialmente los fibroblastos peritumorales. Los CAFs constituyen un grupo heterogéneo de fibroblastos peritumorales que tienen propiedades similares a las células madre mesenquimales (185–187). Es bien conocido que los fibroblastos segregan factores de crecimiento, favorecen la angiogénesis, transfieren substratos a células vecinas y disminuyen la actividad de las células NK al modular la respuesta inmune. Por todo esto, se especula que facilitan el crecimiento tumoral y favorecen un ambiente de inmunosupresión que evita la eliminación de las células tumorales, favoreciendo el secuestro de fármacos y la radioprotección (188).

El equipo del Dr. Barneo ha enfocado sus investigaciones en los CAFs (99,172,189,190) y en una proteína de la familia del colágeno, el colágenoXI α 1, universalmente sobreexpresada en el estroma de los tumores epiteliales (191), concretamente en el citoplasma de los CAFs y no en las células epiteliales. El anticuerpo anti-procollagenXI α 1 tiñe específicamente los CAFs (189), a diferencia de otros marcadores mesenquimales como la vimentina y la α SMA que tiñen una amplia variedad de fibroblastos, como los fibroblastos normales, asociados a inflamación o al proceso de reparación de heridas, etc.

Partiendo de la hipótesis de que los CAFs contribuyen a la progresión tumoral y al desarrollo de metástasis, realizamos distintos estudios. Por un lado, aislamos fibroblastos normales y peritumorales procedentes de tumores de colon y los cultivamos, con el objetivo de generar un modelo animal de cáncer de colon en ratones inmunodeprimidos. Por otro lado, analizamos tumores de pacientes con cáncer de colon para estudiar el estroma y los CAFs como posibles factores pronósticos, contribuyendo así a una mejor estadificación tumoral.

Aunque es habitual que los cultivos de NF y CAFs a partir de tumores de colon humano tenga baja rentabilidad porque se contaminan con frecuencia, el hecho de que en los trasplantes que realizamos solo con CAFs ningún animal desarrollase tumor, confirma que en nuestro estudio las células no fueron contaminadas con células tumorales. En otros

modelos de xenotrasplantes tampoco se desarrolló tumor con la administración de CAFs (181,182).

Los fibroblastos de tejido normal no se tiñeron con α -SMA ni con procollagenXI α 1; sin embargo, en los cultivos, algunos fibroblastos obtenidos de áreas no tumorales adquirieron positividad para esos marcadores debido a las condiciones artificiales a las que habían sido sometidos. Las células cultivadas provenientes de tejido peritumoral resultaron ser fibroblastos tanto por su morfología como por la expresión inmunocitoquímica de marcadores mesenquimales inespecíficos (vimentina, α -SMA), pero también mostraron tinción específica de CAFs (procollagenXI α 1). El porcentaje de células mesenquimales marcadas exclusivamente con CK19 fue escaso, si bien se observaron células con doble tinción procollagenXI α 1+/CK19+. Este doble fenotipo mesenquimal/epitelial es característico de las células en transición epitelio-mesénquima, lo que apoyaría la teoría de que este podrían ser el origen de los CAFs (99).

Esta teoría, que defiende la transición epitelio-mesénquima (EMT) como origen de los CAFs, indica que bajo condiciones de inflamación crónica las células epiteliales sufren una transición EMT para adquirir un fenotipo similar al miofibroblasto y participan en la síntesis de la matriz fibrótica (66,192). Sin embargo, otros autores rechazan esta hipótesis (66,193,194). Nuestros datos apoyan esta teoría, al encontrar en algunos fibroblastos macadores mesenquimales y epiteliales.

En la literatura hay controversia en cuanto al origen de los CAFs, debido a la ausencia de un marcador específico en la mayoría de los estudios (187). Estas células expresan α -SMA, vimentina y proteína activadora de fibroblastos (FAP- α); sin embargo, estas proteínas también son marcadores de fibroblastos activados o miofibroblastos (66,76,195). Parece que el origen más probable de los CAFs son los fibroblastos normales de los tejidos adyacentes (66,76,196–198), ya que se ha visto que el co-cultivo de fibroblastos normales con células tumorales hace que los fibroblastos adquieran un perfil similar al de los CAFs (76). Kojima y col. demostraron, en un modelo de xenotrasplante de cáncer de mama, que los fibroblastos normales de mama progresivamente se convertían en células similares a los CAFs, con aumento en la expresión de α -SMA y capacidad protumoral durante el curso de la progresión tumoral (66,199). Esta teoría defiende que las células tumorales puedan reprogramar a los fibroblastos normales convirtiéndolos en CAFs, con actividad protumoral. Este proceso estaría mediado por

factores derivados de células tumorales como TGF- β , CXCL 12 (66,199). Sin embargo, varios estudios indican que el fenotipo CAF puede persistir en ausencia de exposición continuada a dichos factores (66,91). Se ha observado que estas células adquieren la capacidad de expresar citoquinas que actúan para iniciar y mantener su diferenciación, por lo que podrían autorregularse (66,199). También serían capaces de adquirir cambios genéticos y epigenéticos irreversibles, al igual que las células tumorales epiteliales (66,200).

Otros autores han propuesto que los CAFs podrían derivar de las células madres mesenquimales derivadas de la médula ósea (MSCs), ya que tienen un inmunofenotipo similar y poseen potencial para diferenciarse en varios tipos de líneas celulares (66,201). Se ha visto que las MSCs cultivadas *in vitro* con células de adenocarcinoma y TGF- β 1 pueden promover el crecimiento celular y presentan un fenotipo que se asemeja al de los miofibroblastos de cáncer de colon procolágeno XI α 1 (101).

Se ha visto que hay heterogenicidad entre los CAFs en varios tipos de cáncer, incluyendo el colorrectal, lo que ha dado origen a varias teorías. Por un lado, esto podría deberse a que provengan de distinto origen (66,202). Como alternativa, los CAFs podrían generarse por la interacción entre las células tumorales y las que constituyen el micromedioambiente tumoral (66,75,187), por lo tanto, la heterogenicidad del medioambiente tumoral podría inducir una gran variedad en los CAFs (66,203).

Continuando con nuestros datos, en cuanto a la cinética de crecimiento, se vio que los CAFs presentaban una mayor proliferación frente a los fibroblastos no tumorales. Esto concuerda con otros estudios realizados por el grupo del Dr. Barneo, en un modelo de cáncer de páncreas, cultivando los fibroblastos con células CAPAN-1, se observó una mayor proliferación de éstas en presencia de fibroblastos peritumorales frente a los fibroblastos no tumorales o sin la presencia de fibroblastos (178).

Hemos comprobado que los fibroblastos humanos trasplantados en animales se pueden visualizar por medio del anti-procollagenXI α 1 y distinguirlos de los propios de los animales al ser un anticuerpo específico humano y no presentar reacción cruzada con otras especies (204), lo que serviría para hacer un seguimiento temporal de los mismos en el animal.

Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue encontrar un modelo animal adecuado para el estudio del cáncer de colon metastásico. El modelo animal ideal tiene que cumplir

los criterios de facilidad técnica, alto grado de implantación en corto tiempo, reproducible y con historia natural similar a la enfermedad humana. Para lograr estos requisitos y facilitar el desarrollo del cáncer, juegan un papel relevante la matriz peritumoral y los fibroblastos inmersos en ella, los CAFs (66,205). En un estudio previo del equipo del Dr. Barneo, se desarrolló un modelo de xenotrasplante ortotópico de adenocarcinoma ductal de páncreas humano en ratones SCID, donde la implantación conjunta de las células cancerosas con CAFs daba lugar a un tumor muy agresivo con gran crecimiento local y con metástasis hepáticas a las 3-4 semanas del trasplante en la cabeza del páncreas del animal (178).

En un intento de simular la enfermedad humana en los animales para poder aplicar nuevos tratamientos, se han creado diferentes modelos animales de cáncer (115,206). Los animales modificados genéticamente con este fin, los GEMM, pueden ayudar a aclarar el papel de diferentes genes en la aparición de la enfermedad. La principal desventaja de estos modelos es que las alteraciones afectan a la línea germinal, por lo que pueden presentar trastornos desde la etapa embrionaria. Además desarrollan lesiones precancerosas o cancerosas a otros niveles (206). El control del inicio del tumor es una ventaja de los cánceres inducidos químicamente o mediante implantación de células tumorales (30,206). En cuanto a la administración de sustancias carcinógenas, el proceso depende de la duración y dosis, y del estado del organismo (30). Un inconveniente en general en estos experimentos es el escaso desarrollo metástasis (206).

El modelo más utilizado por los investigadores para ensayar nuevos tratamientos es el xenotrasplante de células cancerosas humanas en animales inmunodeprimidos, usualmente ratones SCID y variantes; bien sea en el órgano donde se da el tumor (xenotrasplante ortotópico), ya sea en otra región anatómica, como en el tejido subcutáneo (xenotrasplante heterotópico). En los xenotrasplantes se utilizan células de líneas tumorales comerciales o pequeñas secciones de muestras tumorales extraídas de los pacientes, los PDX (patient derived xenograf). Las secciones se obtienen de tumores en fresco y deben ser implantadas lo más pronto posible, dentro de las primeras 24 horas (166,207). Los PDX tienen la ventaja de que el animal recibe todo el “ambiente” tumoral del paciente: tumor y reacción inflamatoria peritumoral (165). Además serían apropiados para ensayar tratamientos personalizados (208,209). Sin embargo tiene la desventaja del uso de animales inmunodeprimidos, el estroma que se forma es murino (no humano) y a

veces no se desarrollan metástasis (165). Además, su utilización clínica no está exenta de dificultades: crecimiento lento del tumor, necesidad de trasplante a otros animales para tener un número suficiente para los tratamientos, controles, costes, etc.

Uno de los primeros modelos quirúrgicos desarrollados fue el trasplante heterotópico de células de cáncer de colon humano en tejido subcutáneo de ratones inmunodeprimidos. En este modelo, el crecimiento se puede monitorizar fácilmente, pero al estar situado extraabdominalmente, no desarrolla metástasis (118). Algunos autores, que consideran el trasplante ortotópico como el modelo que mejor simula el proceso de desarrollo del cáncer de colon humano, han utilizado el trasplante heterotópico en tejido subcutáneo para la obtención de muestras que se implantan posteriormente en el colon de otros ratones (118,162,163).

En los últimos años se han desarrollado organoides, que son conjuntos de células cultivadas *in vitro* formando una estructura tridimensional. Sus características anatómicas y funcionales son más parecidas a las del órgano original. Se han realizado a partir de células madre sanas y tumorales, lo que ha permitido estudiar el comportamiento y la reacción a fármacos en ambos casos (170).

Para evitar los inconvenientes de la baja incidencia de aparición del tumor, lento desarrollo, ausencia de metástasis y coste económico, que presentan los modelos anteriormente mencionados, decidimos ensayar un modelo de xenotrasplante que consistió en implantar CAFs obtenidos de muestras frescas de cáncer de colon conjuntamente con células tumorales HT-29 en ratones SCID.

En este estudio decidimos aplicar el modelo de cáncer de colon heterotópico porque el grupo del Dr. Barneo ya estaba entrenado en la técnica del xenotrasplante, ya que había desarrollado con anterioridad un modelo de cáncer de páncreas (178). Se eligió el páncreas como lugar de implante porque en este órgano se desarrollan tumores muy agresivos con gran capacidad de metástasis y alta mortalidad. Esto es debido a varios mecanismos, entre ellos la influencia de factores tróficos segregados por los islotes (210). Teniendo en cuenta la hipótesis de que la matrix extracelular, en especial los fibroblastos, fomenta la progresión tumoral, en este nuevo modelo de trasplante asociamos CAFs cultivados a partir de muestras quirúrgicas con células HT-29.

Realizamos un grupo control con trasplante de CAFs sin células tumorales, para comprobar que estas células por si solas no eran capaces de desarrollar tumor. En los

otros grupos experimentales se trasplantaron células de la línea tumoral de cáncer de colon, solas y asociadas a NF o CAFs. En ambos grupos se desarrollaron tumores y múltiples metástasis, siendo mayor el tamaño tumoral con la asociación de CAFs. Nuestro equipo tiene la experiencia de que la asociación de NF genera tumores más grandes que si se trasplantan solo células de cáncer de colon; y si se asocian CAFs, el tamaño tumoral es mayor (178). Esto demuestra la importancia de la matriz extracelular, en especial de los CAFs, en el desarrollo del cáncer de colon. Además en este modelo se desarrollaron metástasis hepáticas y pulmonares, a diferencia de modelos heterotópicos clásicos

Por último, estudiamos muestras de cáncer de colon de pacientes intervenidos en nuestro centro hospitalario para analizar la relación entre el estroma y algunos factores pronósticos. El estroma y los CAFs podrían ser marcadores útiles para predecir la recurrencia de distintos tipos de tumores, incluido el CCR (66,75). Algunos autores defienden que cuantos más fibroblastos hay en el tumor, peor es el pronóstico (33,76,211). Otros estudios afirman que un porcentaje alto de estroma intratumoral en cáncer de colon predice un peor pronóstico (33,66,212–215). Esto se ha evaluado también en cáncer de mama y esófago, actuando como factor pronóstico independiente (33,211,216). Además, se ha descrito que el contenido de estroma y el nivel de activación de los CAFs presente en el tumor tienen valor pronóstico en el cáncer colorrectal (37). En varios estudios en los que se ha cuantificado el TSR (ratio tumor-stroma) se ha observado que una mayor cantidad de estroma se relaciona con peor pronóstico. Aunque esto ocurre en todos los estadios, podría ser especialmente útil en el estadio II, donde la identificación de pacientes con mayor riesgo de recidiva o metástasis ayudaría a decidir el tratamiento complementario. Así, Huijbers y cols. clasificaron como de alto riesgo el 14% de los pacientes con estadio II mediante la cuantificación del TSR (33,37). También se ha observado que el TSR se relaciona con la invasión local del tumor (mayor porcentaje de estroma del tumor en las zonas de mayor invasión T) y que es un factor pronóstico independiente del estadio ganglionar (37).

La vía TGF- β juega un papel importante en el desarrollo tumoral, actuando al principio como supresor, promoviendo la apoptosis en células normales y en estadios iniciales, y más adelante promoviendo la progresión tumoral. Parece que los altos niveles de TGF- β 1 se relacionan con peor pronóstico. Los CAFs activados por TGF- β secretan factores de crecimiento que propician el crecimiento tumoral e inducen fenotipo

mesenquimal en las células tumorales (37).

Los CAFs expresan α -SMA, FAP- α y SDF-1/CXL12 (33,66). Se ha constatado que los tumores con abundantes CAFs α -SMA positivos se asocian también a menor supervivencia libre de enfermedad en estadios II y III de CCR tras cirugía curativa (66). También parece que los pacientes con alta expresión de FAP- α en el estroma intratumoral de cáncer de colon tienen una enfermedad más agresiva con progresión a metástasis o recurrencia (66,217).

La relación entre el estroma tumoral, los fibroblastos y el pronóstico podría utilizarse para identificar a los pacientes con alto riesgo de recurrencia tumoral, sobre todo en el estadio II, pudiendo administrar así un tratamiento más individualizado.

En nuestro estudio, al igual que lo publicado en la literatura hasta ahora, observamos que el mayor contenido de estroma en el tumor se relacionó con estadios avanzados. Sin embargo, fueron los pacientes con estadios iniciales los que presentaron mayor número de CAFs y su área. Para explicar este hecho proponemos la teoría de que en estadios iniciales los CAFs se comportarían como células de la transición epitelio-mesénquima e irían a invadir precozmente local y a distancia. En estadios avanzados, el tamaño tumoral es mayor, por lo que proporcionalmente habría menos CAFs en cada muestra estudiada, pero serían más en términos absolutos. En estadios iniciales, la matriz es menor pero rica en CAFs; en estadios tardíos, la matriz es mayor, por lo que los CAFs se encuentran más diluidos.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1) Respecto al Objetivo 1 (*Obtención, cultivo y curvas de crecimiento de fibroblastos normales y peritumorales de muestras quirúrgicas de adenocarcinoma de colon humano*), se concluye que:

- La obtención de fibroblastos normales y peritumorales es factible.
- Las curvas de crecimiento de los fibroblastos obtenidos de áreas no tumorales difieren de los peritumorales de cáncer de colon, mostrando éstos un crecimiento mayor estadísticamente significativo.
- La inmunocitoquímica reveló que las células obtenidas y cultivadas eran fibroblastos con características tintoriales anti-proCOL1A1+ y α -SMA+, es decir del tipo CAFs.

2) Respecto al Objetivo 2 (*Desarrollo de un modelo de xenotrasplante de cáncer de colon humano en ratones inmunodeprimidos, asociando o no fibroblastos peritumorales*) se concluye que:

- Los fibroblastos peritumorales por sí solos no determinan el desarrollo del tumor.
- Es un modelo que permite generar tumores de forma precoz.
- Los diferentes modelos de xenotrasplante permiten generar tumores con metástasis en un alto porcentaje de casos (mayor del 87%).
- La asociación de fibroblastos peritumorales humanos a células HT-29 genera tumores de mayor tamaño con metástasis hepáticas y pulmonares, que si se trasplantan asociados a fibroblastos normales, o sólo con células HT-29.
- Se demostró la existencia de los CAFs humanos en las muestras de los xenotraplantes.

3) Finalmente, respecto al Objetivo 3 (*Análisis retrospectivo de pacientes intervenidos de cáncer de colon, analizando las muestras anatomopatológicas de dichos tumores con distintas tinciones para valorar la relación entre matriz peritumoral y pronóstico*) se

concluye que:

- La cantidad de estroma peritumoral es mayor en estadios avanzados del cáncer de colon.
- A diferencia de otros autores, no encontramos ninguna relación entre las distintas variables estudiadas del estroma peritumoral y el pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953.
2. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014 [Internet]. Volumen 2. 1ª Edición. Lyon: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. 2014. [actualizado 2014; citado 3 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>.
3. Scientific American Surgery. Gastrointestinal Tract & Abdomen Surgery. Volumen 2. Adenocarcinoma de colon y recto. Barcelona: Continuing Medical Communication S.L.; 2016.
4. García-Granero E, Frasson M. Cáncer de colon. En: Asociación Española de Cirujanos. Sección de Coloproctología. Guía clínica de la Asociación Española de Cirujanos. Cirugía Colorrectal. 2ª ed. Madrid: Arán Ediciones; 2012. p.265-276.
5. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del Cáncer en España en 2020. [Internet]. SEOM. 2020 [actualizado 2019; citado 15 febrero 2020]. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf.
6. Espín Basany E, García Aguilar J. Cáncer colorrectal: aspectos generales y lesiones precancerosas. En: Asociación Española de Cirujanos. Cirugía AEC Manual de la Asociación Española de Cirujanos. 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010. p. 499-518.
7. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer*. 2012;118(14):3636-4364.
8. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. CA Global

cancer statistics, 2012. *Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.

9. Asociación Española contra el Cáncer. [Internet]. Madrid, España: AECC; [actualizado 2018; citado 3 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-colon/evolucion-cancer-colon>.
10. Rashidi B, Sun FX, Jiang P, An Z, Gamagami R, Moossa AR, et al. A nude model of masive liver and lymph node metastasis of human colon cancer. *Anticancer Res.* 2020;20(2A):715-722.
11. Roy S, Majumdar A. Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal.* 2012; 7: 11.
12. Jayasinghe C, Simiantonaki N, Kirkpatrick CJ. Histopathological features predict metastatic potential in locally advanced colon carcinomas. *BMC Cancer.* 2015;15:14.
13. AsturSalud. Portal de Salud del Principado de Asturias [Internet]. Asturias: Servicio de Salud del Principado de Asturias. [actualizado 3 mayo 2019; citado 1 noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.astursalud.es/noticias/-/noticias/el-gobierno-de-asturias-implantara-el-13-de-mayo-el-programa-de-cribado-de-cancer-de-colon-en-el-area-del-valle-del-nalon>.
14. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa A-E. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci.* 24 de diciembre de 2020;22(1):E130.
15. Qamar TR, Syed F, Nasir M, Rehman H, Zahid MN, Liu RH, et al. Novel Combination of Prebiotics Galacto-Oligosaccharides and Inulin-Inhibited Aberrant Crypt Foci Formation and Biomarkers of Colon Cancer in Wistar Rats. *Nutrients.* 2016;8(8).
16. Benson AB. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm JMCP.* 2007;13(6 Suppl C):S5-18.
17. Watson AJM, Collins PD. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis Basel Switz.* 2011;29(2):222-228.
18. Johnson RL, Fleet JC. Animal Models of Colorectal Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013; 32(0): 39–61. doi:10.1007/s10555-012-9404-6.
19. Poulsen M, Mortensen A, Binderup M-L, Langkilde S, Markowski J, Dragsted LO. The effect of apple feeding on markers of colon carcinogenesis. *Nutr Cancer.*

2011;63(3):402-409.

20. Tarapore RS, Siddiqui IA, Mukhtar H. Modulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway by bioactive food components. *Carcinogenesis*. 2012;33(3):483-491.
21. Campbell JM, Fahey GC, Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr*. 1997;127(1):130-136.
22. Ebert MN, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel UM, Kautenburger T, Becker TW, Pool-Zobel BL. Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer*. 2001;41(1-2):156-164.
23. Hanselmann RG, Welter C. Origin of Cancer: An Information, Energy, and Matter Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:121.
24. Fry RD, Mahmoud N, Maron DJ, Ross HM, Rombeau J. Colon y recto. En: Townsend CM, Beauchamp DR, Evers BM, Mattox KL. *Sabinston Tratado de Cirugía*. Barcelona: Elsevier; 2009. p. 1392-1398.
25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.
27. Duesberg P, Mandrioli D, McCormack A, Nicholson JM. Is carcinogenesis a form of speciation? *Cell Cycle Georget Tex*. 1 de julio de 2011;10(13):2100-14.
28. Seyfried TN. Cancer as a mitochondrial metabolic disease. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:43.
29. Cooper GM. *La Célula*. 2ª ed. Madrid: Marban; 2002. 627p
30. Karim BO, Huso DL. Mouse models for colorectal cancer. *Am J Cancer Res*. 2013;3(3):240-250.
31. Nakayama T, Morishita T, Kamiya T. Adenomatous polyposis coli gene as a gatekeeper. *Rev Gastroenterol Peru Organo Of Soc Gastroenterol Peru*. 2002;22(2):164-167.
32. Ikeda S, Kishida M, Matsuura Y, Usui H, Kikuchi A. GSK-3 β -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-

catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene*. 2000; 19(4): 537-545.

33. Huijbers A, Tollenaar R a. EM, v Pelt GW, Zeestraten ECM, Dutton S, McConkey CC, et al. The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013;24(1):179-185.

34. Wang W-J, Li L-Y, Cui J-W. Chromosome structural variation in tumorigenesis: mechanisms of formation and carcinogenesis. *Epigenetics Chromatin*. 10 de noviembre de 2020;13(1):49.

35. Chen S, Shen X. Long noncoding RNAs: functions and mechanisms in colon cancer. *Mol Cancer*. 28 de noviembre de 2020;19(1):167.

36. Edge S, Compton C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17:1471–1474.

37. van Pelt GW, Sandberg TP, Morreau H, Gelderblom H, van Krieken JHJM, Tollenaar RAEM, et al. The tumour-stroma ratio in colon cancer: the biological role and its prognostic impact. *Histopathology*. 2018;73(2):197-206.

38. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat Med*. 2015; 21(11): 1350–1356.

39. Instituto Nacional de Cáncer (NCI) [Internet]. EEUU: Instituto Nacional del Cáncer; 2019 [actualizado 18 de marzo de 2021; citado 10 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/pro/tratamiento-colorrectal-pdq>.

40. Capdevila J, Tabernero J. Tratamiento neoadyuvante y adyuvante del cáncer de colon y recto. En: Asociación Española de Cirujanos. Sección de Coloproctología. Guía clínica de la Asociación Española de Cirujanos. Cirugía Colorrectal. 2ª ed. Madrid: Arán Ediciones; 2012. p.301-316.

41. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) [Internet]. Madrid: SEOM; 2020 [actualizado 14 de enero de 2020; citado 1 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/colon-recto?showall=1>.

42. Bobowicz M, Skrzypski M, Czapiewski P, Marczyk M, Maciejewska A, Jankowski M, et al. Prognostic value of 5-microRNA based signature in T2-T3N0 colon cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2016;33(8):765-73. doi:10.1007/s10585-016-9810-1.
43. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004;22(16):3408-19.
44. Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet Lond Engl*. 2007;370(9604):2020-2029.
45. Quasar Collaborative Group. Comparison of fluorouracil with additional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: a randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2000;355(9215):1588-1596.
46. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction, *Semin Cancer Biol*. 2004;14(6):433–439.
47. Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, Lin WW, Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NFkappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression, *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005; 174(3):1647–1656.
48. Mogoantă SS, Lungu C, Ilie C, Albu DF, Totolici B, Neamțu C, et al. Peritumoral inflammatory reaction in colon cancer. Histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol*. 2014, 55(4):1429–1435.
49. Balkwill F, Mantovani A, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond Engl*. 2001;357(9255):539 545.
50. Coussens LM, Werb Z, Inflammation and cancer, *Nature*. 2002; 420(6917):860–867.
51. Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA, Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies, *Anticancer Res*. 2009; 29(7):2727–2737.
52. Choi KW, Hong SW, Chang YG, Lee WY, Lee B, Paik IW, et al. Inflammation-based score (Glasgow prognostic score) as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Ann Surg Treat Res*. 2014;86(6):309-313.

53. Bae SI, Kim YS, Colon cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease, *Clin Endosc.* 2014, 47(6):509-515.
54. Ohtani H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun.* 2007;7:4.
55. Pagès F, Galon J, Fridman WH. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):981–987.
56. Ranieri G, Hot topic: targeting tumor angiogenesis: an update. *Curr Med Chem.* 2012;19(7):937.
57. Ribatti D, Ranieri G, Basile A, Azzariti A, Paradiso A, Vacca A, Tumor endothelial markers as a target in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16(12):1215–1225.
58. Liu Y, Mueller BM, Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB- 231 cells via MAPK pathways. *Biochem Biophys Res Commun,* 2006;344(4):1263–1270.
59. Klampfer L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(4):451–464.
60. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F, Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436–444.
61. Pollard JW, Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(1):71–78.
62. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW, Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol.* 1998;64(3):275–290.
63. Bando H, Toi M, Tumor angiogenesis, macrophages, and cytokines. *Adv Exp Med Biol.* 2000;476:267–284.
64. Fox SB, Taylor M, Grøndahl-Hansen J, Kakolyris S, Gatter KC, Harris AL, Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer. *J Pathol.* 2001;195(2):236–243.
65. Grimshaw MJ, Wilson JL, Balkwill FR, Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur J Immunol.* 2002;32(9):2393–2400.

66. Mukaida N, Sasaki S. Fibroblasts, an inconspicuous but essential player in colon cancer development and progression. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(23): 5301–5316.
67. Ovalle WK, Nahirney PC. Connective Tissue. En: *Netter's Essential Histology.* 2^a ed. Filadelfia: Elsevier; 2008. p. 57-71.
68. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblast in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(5):392-401.
69. Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol.* 2013;229(2):298-309.
70. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83(3):835-870.
71. Allen M, Jones JL. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol.* 2011;223(2):162-176.
72. Flaberg E, Markasz L, Petranyi G, Stuber G, Dicso F, Alchihabi N, et al. High-throughput live-cell imaging reveals differential inhibition of tumor cell proliferation by human fibroblasts. *Int J Cancer.* 2011;128(12):2793-2802.
73. Koliaraki V, Roulis M, Kollias G. Tpl2 regulates intestinal myofibroblast HGF release to suppress colitis-associated tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2012;122(11):4231-4242.
74. Servais C, Erez N. From sentinel cells to inflammatory culprits: cancer-associated fibroblasts in tumour-related inflammation. *J Pathol.* 2013;229(2):198-207.
75. Madar S, Goldstein I, Rotter V. 'Cancer associated fibroblasts' more than meets the eye. *Trends Mol Med.* 2013;19(8):447-453.
76. Berdiel Acer M, Sanz Pamplona R, Calon A, Cuadras D, Berenguer A, Sanjuan X, et al. Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information. *Mol Oncol.* 2014;8(7):1290-1305.
77. Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A. Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene.* 2010;29(12):1732-1740.
78. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 1999;59(19):5002-5011.

79. Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, et al. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(14):4966-4971.
80. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010;12(5):468-476.
81. Lotti F, Jarrar AM, Pai RK, Hitomi M, Lathia J, Mace A, et al. Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J Exp Med*. 2013;210(13):2851-2872.
82. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.
83. Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(1):33-40.
84. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2010;17(2):135-147.
85. Silzle T, Kreutz M, Dobler MA, Brockhoff G, Knuechel R, Kunz-Schughart LA. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur J Immunol*. 2003;33(5):1311-1320.
86. Roulis M, Nikolaou C, Kotsaki E, Kaffe E, Karagianni N, Koliaraki V, et al. Intestinal myofibroblast-specific Tpl2-Cox-2-PGE2 pathway links innate sensing to epithelial homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(43):E4658-E4667.
87. Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol*. 2015;33(4):230-236.
88. Holle AW, Young JL, Spatz JP. In vitro cancer cell-ECM interactions inform in vivo cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016; 97:270-279.
89. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99(19):1441-1454.
90. Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Kruizinga RC, Ananias HJK, et al. CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia NYN*. 2012;14(8):709-718.

91. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-348.
92. de Francesco EM, Lappano R, Santolla MF, Marsico S, Caruso A, Maggiolini M. HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). *Breast Cancer Res*. 2013;15(4):R64.
93. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*. 2014;110(2):469-478.
94. Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- α . *Science*. 2010;330(6005):827-830.
95. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(10):790-811.
96. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA*. 2009;302(6):649-658.
97. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med*. 2012;367(17):1596-1606.
98. García-Ocaña M, Vázquez F, García-Pravia C, Fuentes-Martínez N, Menéndez-Rodríguez P, Fresno-Forcelledo F. Characterization of a novel mouse monoclonal antibody, clone 1E8.33, highly specific for human procollagen 11A1, a tumor associated stromal component. *Int J Oncol*. 2012;40(5):1447-1454.
99. García-Pravia C, Galván JA, Gutiérrez-Corral N, Solar-García L, García-Pérez E, García-Ocaña M, et al. Overexpression of COL11A1 by cancer-associated fibroblasts: clinical relevance of a stromal marker in pancreatic cancer. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e78327. doi:10.1371/journal.pone.0078327.
100. Fischer H, Stenling R, Rubio C, Lindblom A. Colorectal carcinogenesis associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. *Carcinogenesis*.

2001;22(6):875-878.

101. Galván JA, García-Martínez J, Vázquez-Villa F, García-Ocaña M, García-Pravia C, Menéndez-Rodríguez P, et al. Validation of COL11A1/procollagen 11A1 expression in TGF- β 1-activated immortalised human mesenchymal cells and in stromal cells of human colon adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:867.

102. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-196.

103. Sipos F, Galamb O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol*. 2012;18(7):601-608.

104. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1429-1437.

105. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785):795-801.

106. Ros Lasierra MA. La vía de Hedgehog: embriogénesis y enfermedad. Redes de señalización y estrategias terapéuticas. [Internet]. *Monogr Real Acad Nac Farm. Monografía XXIV*: 161-183. 2009 [citado 10 de febrero de 2020]. Disponible en: https://bibliotecavirtual.ranf.com/es/catalogo_imagenes/grupo.do?path=6026643.

107. Genetics Home Reference [Internet]. USA: U.S. National Library of Medicine; 2010 [actualizado 2010; citado 2020]. Disponible en: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SHH>.

108. Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*. 2009;1(6-7):338-51.

109. Olsen C, Hsu PP, Glienke J, Rubanyi GM, Brooks AR. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer*. 2004;4:43.

110. Carney TJ, Ingham PW. Drugging Hedgehog: signaling the pathway to translation. *BMC Biology*. 2013;11:37.

111. Montero JL, Tur Marí JA, Romero Vidal A. Modelos de animales. Tipos y Generalidades. En: Zúñiga J, Orellana JM. *Ciencia y Tecnología en Experimentación y Protección Animal*. Madrid: Universidad de Alcalá de Henares, Sociedad Española para

- las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL); 2016. p 113-128.
112. Festing M. International index of laboratory animals. London: Laboratory Animal Ltd; 1987.
113. Giráldez Dávila A, Zúñiga J. La ciencia del animal de laboratorio y el procedimiento experimental. En: Zúñiga J, Orellana JM. Ciencia y Tecnología en Experimentación y Protección Animal. Madrid: Universidad de Alcalá de Henares, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL); 2016. p10-35.
114. Unión Europea (2005). IV informe de la Comisión al Consejo y Parlamento Europeo sobre las estadísticas relativas al número de animales utilizados para fines experimentales u otros fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea. Bruselas, 2005.
115. Taketo MM, Edelmann W. Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology*. 2009;136(3):780-98.
116. Hawk ET, Levin B. Colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(2):378-391.
117. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003;9(11):4227-4239.
118. Mittal VK, Bhullar JS, Bhullar JS, Jayant K. Animal models of human colorectal cancer: Current status, uses and limitations. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(41): 11854-11861.
119. Instituto Nacional de Cáncer (NCI) [Internet]. EEUU: Instituto Nacional del Cáncer; 2016 [citado 10 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://ccr.cancer.gov/Comparative-Oncology-Program>.
120. Church EM, Mehlhaff CJ, Patnaik AK. Colorectal adenocarcinoma in dogs: 78 cases (1973–1984). *J Am Vet Med Assoc*. 1987;191(6):727–730.
121. Valerius KD, Powers BE, McPherron MA, Hutchison JM, Mann FA, Withrow SJ. Adenomatous polyps and carcinoma in situ of the canine colon and rectum: 34 cases (1982–1994). *J Am Anim Hosp Assoc*. 1997;33(2):156-160.
122. McEntee MF, Brenneman KA. Dysregulation of beta-catenin is common in canine sporadic colorectal tumors. *Vet Pathol*. 1999;36(3):228–236.

123. Wolf JC, Ginn PE, Homer B, Fox LE, Kurzman ID. Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors. *Vet Pathol.* 1997;34(5):394-404.
124. Schaffer E, Schiefer B. Incidence and Types of Canine Rectal Carcinomas. *Journal of Small. Animal Practice.* 1968;9(10):491–496.
125. Cribb AE. Feline gastrointestinal adenocarcinoma: a review and retrospective study. *Can Vet J.* 1988;29(9):709–712.
126. Munday JS, Brennan MM, Jaber AM, Kiupel M. Ovine Intestinal Adenocarcinomas: Histologic and Phenotypic Comparison with Human Colon Cancer. *Comp Med.* 2006;56(2):136–141.
127. Lushbaugh CC, Humason GL, Swartzendruber DC, Richter CB, Gengozian N. Spontaneous colonic adenocarcinoma in marmosets. *Primates Med.* 1978;10:119–134.
128. Cheverud JM, Tardif S, Henke MA, Clapp NK. Genetic epidemiology of colon cancer in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Hum Biol.* 1993;65(6):1005–1012.
129. Wood JD, Peck OC, Tefend KS, Stonerook MJ, Caniano DA, Mutabagani KH, et al. Evidence that colitis is initiated by environmental stress and sustained by fecal factors in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Dig Dis Sci.* 2000;45(2):385–393.
130. Mansfield KG, Lin KC, Xia D, Newman JV, Schauer DB, MacKey J, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* and ulcerative colitis in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *J Infect Dis.* 2001;184(6):803–807.
131. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* 2012;148(1-2):349-61.
132. Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990;247(4940):322-324.
133. Nnadi SC, Watson R, Innocent J, Gonye GE, Buchberg AM, Siracusa LD. Identification of Five Novel Modifier Loci of *Apc^{Min}* Harbored in the BXH14 Recombinant Inbred Strain. *Carcinogenesis.* 2012;33:1589-1597.
134. Caldwell CM, Green RA, Kaplan KB. APC mutations lead to cytokinetic failures in vitro and tetraploid genotypes in *Min* mice. *J Cell Biol.* 2007;178(7):1109-1120.
135. Robanus-Maandag EC, Koelink PJ, Breukel C, Salvatori DC, Jagmohan-Changur SC, Bosch CA, et al. A new conditional *Apc*-mutant mouse model for colorectal cancer.

Carcinogenesis. 2010;31(5):946-952.

136. Edelmann W, Yang F, Kuraguchi M, Heyer J, Lia M, Kneitz B, et al. Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer Res.* 1999;59(6):1301–1307.

137. Reiss C, Haneke T, Volker HU, Spahn M, Rosenwald A, Edelmann W, Kneitz B. Conditional inactivation of MLH1 in thymic and naive T-cells in mice leads to a limited incidence of lymphoblastic T-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2010; 51:1875-1886.

138. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell.* 1995;82(2):321-330.

139. Pineda M, Castellsague E, Musulen E, Llord G, Frebourg T, Baert-Desurmont S, et al. Non-Hodgkin lymphoma related to hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a patient with a novel heterozygous complex deletion in the MSH2 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47(4):326-332.

140. Reitmair AH, Redston M, Cai JC, Chuang TC, Bjerknes M, Cheng H, et al. Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. *Cancer Res.* 1996;56(16):3842–3849.

141. Chen PC, Dudley S, Hagen W, Dizon D, Paxton L, Reichow D, et al. Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. *Cancer Res.* 2005;65(19):8662–8670.

142. Kucherlapati MH, Lee K, Nguyen AA, Clark AB, Hou H, Rosulek A, et al. An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents. *Gastroenterology.* 2010;138(3):993-1002.e1.

143. Magalhaes B, Peleteiro B, Lunet N. Dietary patterns and colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP.* 2012;21(1):15–23.

144. Newmark HL, Lipkin M, Maheshwari N. Colonic hyperplasia and hyperproliferation induced by a nutritional stress diet with four components of Western-style diet. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(6):491-696.

145. Richter F, Newmark HL, Richter A, Leung D, Lipkin M. Inhibition of Western-diet induced hyperproliferation and hyperplasia in mouse colon by two sources of

- calcium. *Carcinogenesis*. 1995;16(11):2685–2689.
146. Risio M, Lipkin M, Newmark H, Yang K, Rossini FP, Steele VE, et al. Apoptosis, cell replication, and Western-style diet-induced tumorigenesis in mouse colon. *Cancer Res*. 1996; 56(21):4910–4916.
147. Newmark HL, Yang K, Kurihara N, Fan K, Augenlicht LH, Lipkin M. Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(1):88–92
148. Newmark HL, Yang K, Lipkin M, Kopelovich L, Liu Y, Fan K, et al. A Western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C57Bl/6 mice. *Carcinogenesis*. 2001;22(11):1871–1875
149. van Zeeland AA. Molecular dosimetry of chemical mutagens. Relationship between DNA adduct formation and genetic changes analyzed at the molecular level. *Mutat Res*. 1996;353(1-2):123-150.
150. Bissahoyo A, Pearsall RS, Hanlon K, Amann V, Hicks D, Godfrey VL, et al. Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2005;88(2):340-345.
151. Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, et al. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res*. 1999;59(18):4506-9.
152. Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Kawabata K, Matsunaga K, Shimizu M, et al. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2000;60(13):3323–3327.
153. Felton JS, Knize MG, Shen NH, Lewis PR, Andresen BD, Happe J, et al. The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*. 1986;7(7):1081–1086.
154. Nakagama H, Nakanishi M, Ochiai M. Modeling human colon cancer in rodents using a foodborne carcinogen, PhIP. *Cancer Sci*. 2005;96(10):627–636.
155. Tanaka T, Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Takahashi M, Wakabayashi K. Colonic

adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess beta-catenin gene mutations and increases immunoreactivity for beta-catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis*. 2005;26(1):229–238.

156. Andreassen A, Vikse R, Mikalsen A, Adamovic T, Steffensen IL, Hjertholm H, et al. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) induces genetic changes in murine intestinal tumours and cells with ApcMin mutation. *Mutat Res*. 2006;604(1-2):60–70.

157. Takahashi T, Morotomi M, Nomoto K. A novel mouse model of rectal cancer established by orthotopic implantation of colon cancer cells. *Cancer Sci*. 2004;95(6):514–519.

158. Kishimoto H, Momiyama M, Aki R, Kimura H, Suetsugu A, Bouvet M, et al. Development of a clinically-precise mouse model of rectal cancer. *PLoS One*. 2013;8(11):e79453.

159. Donigan M, Norcross LS, Aversa J, Colon J, Smith J, Madero- Visbal R, et al. Novel murine model for colon cancer: non-operative trans-anal rectal injection. *J Surg Res*. 2009;154(2):299-303.

160. Zigmund E, Halpern Z, Elinav E, Brazowski E, Jung S, Varol C. Utilization of murine colonoscopy for orthotopic implantation of colorectal cancer. *PLoS One*. 2011;6(12):e28858.

161. Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B, Tilak J, Andrus L, Decker M, et al. A novel nonoperative orthotopic colorectal cancer murine model using electrocoagulation. *J Am Coll Surg*. 2011;213(1):54-60; discussion 60-61.

162. Flatmark K, Maelandsmo GM, Martinsen M, Rasmussen H, Fodstad Ø. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2004;40(10):1593-1598.

163. Fodstad O. Tumorigenicity and dissemination of human tumors in congenitally immune-deficient mice. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83(19):1419-1420.

164. Pocard M, Tsukui H, Salmon RJ, Dutrillaux B, Poupon MF. Efficiency of orthotopic xenograft models for human colon cancers. *In Vivo*. 1996;10(5):463-469.

165. Katsiampoura A, Raghav K, Jiang Z-Q, Menter DG, Varkaris A, Morelli MP, et al. Modeling of Patient-Derived Xenografts in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(7):1435-42.
166. Fu XY, Besterman JM, Monosov A, Hoffman RM. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(20):9345-9349.
167. Ogata Y, Hara Y, Akagi Y, Ohkita A, Morodomi T, Shirouzu K. Metastatic model of human colon cancer constructed using orthotopic implantation in nude mice. *Kurume Med J.* 1998;45(1):121-125.
168. Hackl C, Man S, Francia G, Milsom C, Xu P, Kerbel RS. Metronomic oral topotecan prolongs survival and reduces liver metastasis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. *Gut.* 2013;62(2):259-271.
169. Priolli DG, Abrantes AM, Neves S, Batista JN, Cardinalli IA, Botelho MF. A novel model of distal colon cancer in athymic mice. *Acta Cir Bras.* 2012;27(6):355-360.
170. Young M, Reed KR. Organoids as a Model for Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2016;12(5):281-7.
171. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-92.
172. Galván JA, García-Martínez J, Vázquez-Villa F, García-Ocaña M, García-Pravia C, Menéndez-Rodríguez P, et al. Validation of COL11A1/procollagen 11A1 expression in TGF- β 1-activated immortalised human mesenchymal cells and in stromal cells of human colon adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2014;14:867.
173. ATCC [Internet]. Manassas, Virginia: ATCC;[actualizado 2016; citado 2018]. Disponible en: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-38.aspx>.
174. Salvador N, Guillén J, Peralta JM. Biología general y mantenimiento de las especies más utilizadas. En: Zúñiga J, Orellana JM. *Ciencia y Tecnología en Experimentación y Protección Animal*. Madrid: Universidad de Alcalá de Henares, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL); 2016. p 129-184.
175. Benavides FJ, Guénet JL. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio*.

Madrid: Universidad de Alcalá de Henares, Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL); 2003. p 60.

176. Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol.* 2001;22(7):386-93.

177. Universidad de Oviedo [Internet]. Oviedo: Universidad de Oviedo; [citado 2021]. Servicios Científico Técnicos. Bioterio e imagen preclínica; [1 pantalla]. Disponible en: <https://www.sct.uniovi.es/unidades/experimentacion-animal/bioterio/presentacion>.

178. Porrero Guerrero B. Papel de los fibroblastos peritumorales en la progresión del cáncer de páncreas humano: estudio del gen erizo. [Tesis doctoral]. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2017.

179. University of Birmingham [Internet]. Birmingham: Landini G; 2004 [actualizado 2020; citado 2017]. Novel context-based segmentation algorithms for intelligent microscopy. *Colour Deconvolution 2*; [1 pantalla]. Disponible en: <https://blog.bham.ac.uk/intellimic/g-landini-software/colour-deconvolution-2/>

180. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001;23:291-299.

181. Porrero Guerrero B, Vazquez Villa JF, Fernández García MT, Fernando Macías E, Arévalo López C, García Pérez E, Suarez Fernández L, García De La Fuente V, Gómez Pinillos V, García Pravia C, García Ocaña M, De los Toyos JR, Barneo Serra L. 2015. Influence of mesenchymal cells at the tumor growth in a model animal orthotopic xenograft of human pancreatic adenocarcinoma. [Abstract] Abstracts of the 20th Congress of the Spanish Society for Surgical Research, Albacete, October 2014, *British Journal of Surgery (Suppl 1)*: 1-26.

182. Rodríguez Uría R, Fernando Macías E, Fernandez García MT, Muñoz Salgueiro MC, Vazquez Villa JF, Porrero Guerrero B, López-Arevalo CA, Sanz Navarro S, Barneo Caragol C, Barneo Serra L. 2018. Mesenchymal cells use as an alternative to peritumoral fibroblasts for the study of tumor growth in an animal model of human pancreatic adenocarcinoma. [Abstract] Abstracts of the 23rd Congress of the Spanish Society for Surgical Research, Madrid, November 2017. *British Journal of Surgery (Suppl 2)*: 5-14.

183. Porrero Guerrero B, López Arévalo C, Fernando Macias E, Ugalde Serrano P, García Pérez E, Suárez Fernández L, Galván Hernández JA, Vázquez Villa JF, Castro

- Santos P, de los Toyos González JR, González del Rey MC, Menéndez Rodríguez MP, García Pravia C, Barneo Serra L. 2013. A new model of orthotopic human pancreatic carcinoma xenograft. [Abstract] Abstracts of the 18th Congress of the Spanish Society for Surgical Investigations, Leon, October 2012. *British Journal of Surgery (Suppl 1)*: 1–20.
184. Fernando Macías E, Fernández García MT, García Pérez E, Porrero Guerrero B, López Arévalo C, Rodríguez Uría R, et al. A new aggressive xenograft model of human colon cancer using cancer-associated fibroblasts. *PeerJ*. 2020;8:e9045.
185. Valcz G, Sipos F, Tulassay Z, Molnar B, Yagi Y. Importance of carcinoma-associated fibroblast-derived proteins in clinical oncology. *J Clin Pathol*. 2014;67(12):1026-1031.
186. Huang L, Xu A-M, Liu S, Liu W, Li T-J. Cancer-associated fibroblasts in digestive tumors. *World J Gastroenterol WJG*. 2014;20(47):17804-17818.
187. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014;211(8):1503-1523.
188. Whittle MC, Hingorani SR. Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Biological Mechanisms and Therapeutic Targets. *Gastroenterology*. 2019;156(7):2085-2096.
189. García-Ocaña M, Vázquez F, García-Pravia C, Fuentes-Martínez N, Menéndez-Rodríguez P, Fresno-Forcelledo F, et al. Characterization of a novel mouse monoclonal antibody, clone 1E8.33, highly specific for human procollagen 11A1, a tumor-associated stromal component. *Int J Oncol*. 2012;40(5):1447-1454.
190. Fuentes-Martínez N, García-Pravia C, García-Ocaña M, Menéndez-Rodríguez P, Del Amo J, Suárez-Fernández L, et al. Overexpression of proCOL11A1 as a stromal marker of breast cancer. *Histol Histopathol*. 2015;30(1):87-93.
191. Vázquez-Villa F, García-Ocaña M, Galván JA, García-Martínez J, García-Pravia C, Menéndez-Rodríguez P, et al. COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015;36(4):2213-2222.
192. Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 2009;40(10):1365-1376.

193. Dvořánková B, Smetana K, Říhová B, Kučera J, Mateu R, Szabo P. Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol.* 2015;143(5):463-469.
194. Wang M, Wu C-P, Pan J-Y, Zheng W-W, Cao X-J, Fan G-K. Cancer-associated fibroblasts in a human HEP-2 established laryngeal xenografted tumor are not derived from cancer cells through epithelial-mesenchymal transition, phenotypically activated but karyotypically normal. *PloS One.* 2015;10(2):e0117405.
195. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75(3):487-517.
196. Peng Q, Zhao L, Hou Y, Sun Y, Wang L, Luo H, et al. Biological characteristics and genetic heterogeneity between carcinoma-associated fibroblasts and their paired normal fibroblasts in human breast cancer. *PloS One.* 2013;8(4):e60321.
197. Costea DE, Hills A, Osman AH, Thurlow J, Kalna G, Huang X, et al. Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(13):3888-3901.
198. Navab R, Strumpf D, Bandarchi B, Zhu C-Q, Pintilie M, Ramnarine VR, et al. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(17):7160-165.
199. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(46):20009-200014.
200. Hida K, Klagsbrun M. A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res.* 2005;65(7):2507-2510.
201. Paunescu V, Bojin FM, Tatu CA, Gavriliuc OI, Rosca A, Gruia AT, Tanasie G, Bunu C, Crisnic D, Gherghiceanu M, Tatu FR, Tatu CS, Vermesan S. Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J Cell Mol Med.* 2011;15:635-646.
202. Herrera M, Islam ABMMK, Herrera A, Martín P, García V, Silva J, et al. Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors

shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(21):5914-5926.

203. Herrera M, Herrera A, Domínguez G, Silva J, García V, García JM, et al. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci.* 2013;104(4):437-444.

204. Fernández-García MT, Vázquez-Villa JF, García-Martínez J, Sánchez-Pitiot M, Centeno-Ramos I, Fernando-Macías E, Porrero-Guerrero B, López-Arévalo C, Barneo L. 2014. Pro-Col11A1 expression in human peritumoral fibroblasts in model of orthotopic human pancreatic carcinoma xenograft. [Abstract] *British Journal of Surgery (Suppl 1):* 5-5.

205. van Pelt GW, Sandberg TP, Morreau H, Gelderblom H, van Krieken JHJM, Tollenaar RAEM, et al. The tumour-stroma ratio in colon cancer: the biological role and its prognostic impact. *Histopathology.* 2018;73(2):197-206.

206. Johnson RL, Fleet JC. Animal models of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(1-2):39-61.

207. Rashidi B, Sun FX, Jiang P, An Z, Gamagami R, Moossa AR, et al. A nude mouse model of massive liver and lymph node metastasis of human colon cancer. *Anticancer Res.* 2000;20(2A):715-722.

208. Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Establishment of a Patient-Derived Tumor Xenograft Model and Application for Precision Cancer Medicine. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2018;66(3):225-230.

209. Williams JA. Using PDX for Preclinical Cancer Drug Discovery: The Evolving Field. *J Clin Med.* 2018;7(3).

210. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* 2001;15(2):111-127.

211. de Kruijf EM, van Nes JGH, van de Velde CJH, Putter H, Smit VTHBM, Liefers GJ, et al. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(3):687-696.

212. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*

Off J Am Assoc Cancer Res. 2007;13(7):2082-2090.

213. Mesker WE, Liefers G-J, Junggeburst JMC, van Pelt GW, Alberici P, Kuppen PJK, et al. Presence of a high amount of stroma and downregulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I-II colon cancer patients. *Cell Oncol Off J Int Soc Cell Oncol.* 2009;31(3):169-178.

214. Mesker WE, Junggeburst JMC, Szuhai K, de Heer P, Morreau H, Tanke HJ, et al. The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell Oncol Off J Int Soc Cell Oncol.* 2007;29(5):387-398.

215. West NP, Dattani M, McShane P, Hutchins G, Grabsch J, Mueller W, et al. The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2010;102(10):1519-1523.

216. Courrech Staal EFW, Wouters MWJM, van Sandick JW, Takkenberg MM, Smit VTHBM, Junggeburst JMC, et al. The stromal part of adenocarcinomas of the oesophagus: does it conceal targets for therapy? *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2010;46(4):720-728.

217. Henry LR, Lee H-O, Lee JS, Klein-Szanto A, Watts P, Ross EA, et al. Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007;13(6):1736-1741.

ANEXOS

10. ANEXOS

ANEXO 1: PROTOCOLOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS QUIRÚRGICAS PARA INVESTIGACIONES Y REALIZACIÓN DE XENOTRASPLANTES

PROTOCOLO I: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Identificación del paciente

Fecha de la intervención

Localización del tumor

Estadio (cTNM)

Muestras almacenadas en nitrógeno líquido:

-Controles normales (nº de crioviales):

-Peritumoral (nº de crioviales):

-Tumor (nº de crioviales):

Muestras para cultivo:

-Controles normales

-Peritumoral

-Tumor

Diagnóstico AP

Estadio pTNM (adjuntar copia informe AP)

Confirmación de los cultivos (creció/contaminación):

-Controles normales

-Peritumoral

-Tumor

Los cultivos se emplearon para:

-Inmunohistoquímica

-Xenotrasplantes

-Expresión genes

-Western-blot

PROTOCOLO II: TRASLADO DE LA PIEZA QUIRÚRGICA A ANATOMÍA PATOLÓGICA

1. Decidir las intervenciones para obtener muestras (colon/páncreas) con antelación.
2. En el día de la intervención comunicar a los implicados si la pieza es extirpable o no. En caso afirmativo avisar para que esté preparado el contenedor con nitrógeno líquido.

3. El día de la intervención tener preparada una cubeta metálica para la pieza quirúrgica en el congelador, con seis bolsas de 250 ml de suero salino.
4. Obtener suero del paciente en quirófano: dos tubos con tapón rojo.
5. Lo más rápidamente posible, poner la pieza quirúrgica en la cubeta, rodeada de las bolsas de solución salina y trasladarla a Anatomía Patológica.
6. Llamar al responsable de la obtención de muestras para que se persone en Anatomía Patológica.

PROTOCOLO III: OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA CULTIVO Y CONSERVACIÓN EN N₂ LÍQUIDO

1. De forma aséptica, con la pieza dentro de la cubeta rodeada de hielo, con bisturí fino se obtendrá muestra primero del tejido normal, luego del peritumoral y finalmente del tumoral.
2. Primero, se realizarán secciones de 2-3 mm para su conservación en N₂:
 - Crioviales 1-3: tejido normal
 - Crioviales 4-6: peritumoral
 - Crioviales 7-9: tumor
3. Los crioviales se introducirán rápidamente en el contenedor con nitrógeno líquido.
4. Se llevará también los dos tubos de suero del paciente.
5. Después se tomarán las muestras para cultivo (igual que para nitrógeno líquido), pero en tres tubos (normal, peritumoral, tumor) con el líquido de conservación.
6. Si se ha decidido realizar xenotrasplantes: otras tres secciones de tumor en el líquido conservante.
7. Todos los envíos con una hoja de identificación del paciente y fecha.

PROTOCOLO IV: ANESTESIA INHALATORIA

1. Administrar Buprenorfina 0,05mg/kg 15 minutos antes de la IQ
2. Comprobar el nivel de isoflurano en el vaporizador y llenarlo en caso necesario. Abrir la válvula general de la botella de oxígeno.
3. **Inducción:** Colocar el animal en la cámara de inducción anestésica regulando el vaporizador al 5% de isoflurano y flujo de oxígeno a (0.5- 1.0 l/min). Cuando el animal pierda la consciencia, cerrar la llave de entrada a la misma, sacarlo de la cámara, abrir la llave de la mascarilla y colocarle la mascarilla.
4. **Mantenimiento:** regular el vaporizador de anestésico al 2%.
5. **Recuperación:** Desconectar el vaporizador de isoflurano y después el oxígeno (0,5 l/min). Durante la fase de recuperación, se puede dejar al animal ventilando con oxígeno al 100%, en función de su recuperación.
6. Al finalizar el procedimiento administrar Meloxicam 1,5-2 mg/kg.

7. Repetir dosis de Buprenorfina y Meloxicam cada 24h durante 2 días.
PROTOCOLO V: XENOTRASPLANTES EN RATONES INMUNODEPRIMIDOS

Dejar que los animales se aclimaten a su nuevo entorno (una semana).

1. Poner en marcha la campana de flujo laminar.
2. Extraer el animal de la jaula bajo la campana de flujo laminar.
3. Anestesia según protocolo.
4. Clip de identificación en la oreja del animal.
5. Pesar el animal.
6. Colocación en la tabla operatoria.
7. Limpieza de tórax y abdomen con Hibitane/Betadine.
8. Afeitar el abdomen sin producir heridas.
9. Colocación de gasas estériles en los flancos del animal.
10. Laparotomía con tijeras finas hasta el xifoides.
11. Presionando por los flancos, sacar el paquete intestinal, vertiéndolo hacia la izquierda del animal, cubierto con las gasas estériles.
12. Identificación del bazo, estómago, duodeno y páncreas.
13. Inyectar lentamente, en unos 30 segundos, a través de una aguja de 30 G, la solución de células en el órgano elegido.
14. Al extraer la aguja, inmediatamente presionar la zona con suavidad con un bastoncillo de algodón, durante un minuto.
15. Comprobar el aspecto de la zona, y puntuar el procedimiento como: 0, mal ejecutado; 1, dudoso; 2, bien.
16. Recolocar las vísceras en el abdomen.
17. Cierre de la laparotomía con material fino (seda 4-5/0).
18. Observación diaria del animal, y pesarlo cada 7 días.

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS DE XENOTRASPLANTES

PROTOCOLO:

TRATAMIENTO ANTINEOPLÁSICO:

TRASPLANTE N°

FECHA TRASPLANTE:

TIPO DE CÉLULAS INYECTADAS Y PROCEDENCIA:

CANTIDAD:

VOLUMEN:

COMENTARIOS DEL TRASPLANTE (mal, dudoso, bien):

	TX						
DIA							
PESO							
TRATAMIENTO							

DIA							
PESO							
TRATAMIENTO							

OBSERVACIONES EVOLUCIÓN DEL ANIMAL

AUTOPSIA

Fecha:

Hallazgos: -Tamaño tumor en mm (l x a)

-Hígado

-Pulmones

-Peritoneo (ascitis/implantes)

Fijación en paraformaldehído

Foto

TABLA DE VALORACIÓN POR ANIMAL

Ratón N°:	Tipo de experimento						
Fecha experimento: / /	Fecha eutanasia: / /						
Proyecto							
Sustancia tóxica testada:	Marcaje en la oreja:						
Línea tumoral:	Tipo de fibroblasto:						
Tipo de tratamiento tumor							
Persona realiza procedimiento:							
Fecha:							
Día:	1	2	3	4	5	6	7
Hora:							
A distancia							
No activo							
Aislado							
Encorvado							
Abdomen punzante							
Pelo erizado							
Respiración agitada							
No acicalamiento							
Deshidratación piel							
Debilidad o parálisis extremidades							
En el manejo							
No come							
No bebe							
Peso corporal (g)	-	-	-	-	-	-	-
% de cambio desde principio							
Costra roja en ojos							
Orificios sucios (heces u orina)							
No heces							
Diarrea							
Deshidratación-cola rígida							
Vocalización							
Hipotermia							
Extremidades azules							
Fiebre							
Caquexia							
Ascitis							
De procedimiento: toxicidad							
Compuesto tóxico testado							
Fecha inyección							
Malestar después de inyección							
De procedimiento: estudio tumoral							
Compuesto para tratamiento del tumor:							
Día de tratamiento:							
Tamaño tumoral largo							
Tamaño tumoral ancho							

ANEXO 2: PROTOCOLOS PARA CUANTIFICACIÓN DE ColXI α 1 EN MUESTRAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO

RECOGIDA DE DATOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ColXI α 1 EN MUESTRAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO

1. Número de historia clínica
2. Sexo
3. Edad
4. Antecedentes oncológicos personales y familiares
5. Clínica principal
6. Localización del tumor
7. Fecha y tipo de intervención quirúrgica
8. Número de registro del estudio anatomopatológico y bloque o bloques de parafina más representativos del tumor
9. Diferenciación del tumor (bien, moderadamente o poco diferenciado)
10. Clasificación TNM
11. Número de ganglios positivos y número total de ganglios
12. Localización de las metástasis
13. Estadío de Dukes
14. Recidiva o metástasis metacrónicas; y si se resecaron, fecha de la intervención y número de registro del estudio anatomopatológico.
15. Fecha de fallecimiento o de última consulta

Procedimiento de análisis de imágenes para medida del marcaje de colágeno en células peritumorales

1. Introducción.

Cuantificaremos el porcentaje de células peritumorales marcadas con DMTX y el porcentaje de matriz extracelular (Gomori) de dichas zonas. Trabajaremos con dos tipos de imágenes, por un lado las correspondientes a las células marcadas que se tomarán con un objetivo de 20x y un tamaño de imagen de 1360 x 1024 píxeles, de las que se analizarán un número determinado (entre 20 y 30) de campos al azar. De la imagen del Gomori se tomará un mosaico de imágenes con un objetivo de 4x y un tamaño de imagen de 680 x 512 píxeles para cada fragmento del mosaico. En ambos casos se trabajará sobre una zona de referencia previamente marcada sobre el portaobjetos con la sección histológica.

2. Adquisición de imágenes.

Para la adquisición de las imágenes se utilizará el microscopio Olympus BX61 junto con el programa CAST.

Arrancaremos el programa CAST pulsando en el botón correspondiente, seleccionaremos el perfil “angel-settings” y esperaremos a que se realicen todos los test de control del microscopio. A continuación seleccionaremos el objetivo de 20X y nos posicionaremos sobre una zona que contenga tejido y parte del blanco de fondo. Para ajustar el valor del blanco seleccionaremos la herramienta de balance de blanco y marcaremos una pequeña zona sin tejido sobre la imagen. La detección del blanco de fondo es muy importante para que el programa de tratamiento de imágenes detecte bien el marcaje.

Una vez ajustado el blanco volveremos a seleccionar el objetivo de 4X e iremos a realizar un mosaico de la zona de tejido sobre la que vamos a medir el marcaje de las células. Para ello abriremos la ventana de “slide navigator”, marcaremos un punto correspondiente al extremo superior izquierdo de la zona de interés y otro punto correspondiente al extremo inferior derecho, entre ambos definiremos un cuadrado y pulsaremos para realizar el mosaico. Una vez que tengamos el mosaico creado iremos a dibujar la región de interés que contendrá los campos a medir, para ello, en el menú principal, seleccionamos “Región/add” y marcamos con el ratón los límites de la región de interés. Si fuese necesario podemos definir más de una región de interés.

A continuación cambiamos al objetivo de 20x y definimos un tamaño de imagen de 1360x 1024 píxeles, para ello iremos a “System/Camera settings/Camera Resolution”. Para definir los campos de muestreo iremos a “Sampling/Meander Sampling”, en el menú que nos aparece teclearemos el número de campos que deseamos medir y seleccionamos la opción “random” para que estén distribuidos al azar. El % que representan los campos a medir dentro del total de área de muestra nos lo da el programa y deberemos apuntarlo.

NOTA. *Si queremos evitar los campos que no quedan completos dentro de la región de interés debemos dar un número de campos mayor, por ejemplo 40 si queremos medir 30. De este modo podemos despreciar 10 campos a lo largo de toda la muestra.*

Una vez cerrado el menú, aparecerán a lo largo del mosaico una serie de puntos que nos marcan la posición de las distintas imágenes que vamos a analizar y se posicionará sobre el primer campo. Si la imagen del primer campo está completa la guardaremos pulsando en “File/Save image as”. Le daremos como nombre el código de la muestra más el número 01, por ejemplo si el código de la muestra es DMTX1, la imagen será DMTX101. Pulsando en la barra espaciadora nos colocaremos sobre el segundo campo, si está correcto lo grabaremos con el mismo nombre que el anterior y el número 02 (DMTX102) y así sucesivamente hasta completar el número de campos. Si quedan campos por medir seguiremos pulsando la barra espaciadora hasta llegar al último, aunque no los guardaremos. Al final nos aparece un mensaje de “Restart” al que diremos que no. A continuación iremos a la opción “Region” y borraremos todas las regiones marcadas. También borraremos el mosaico de imágenes.

Una vez finalizada la grabación de las imágenes de las células grabaremos la imagen del Gomori, para ello seleccionaremos el objetivo de 4X y cambiaremos el tamaño de imagen a 680 x 512 píxeles. Colocaremos el porta con el marcaje del Gomori en el microscopio. En la ventana del “Slide Navigator” definiremos un recuadro que englobe el área de muestra de interés y realizaremos el mosaico de ese área. La imagen del mosaico resultante la guardaremos para la posterior medida del Gomori. Le daremos el nombre de la muestra con una G al final.

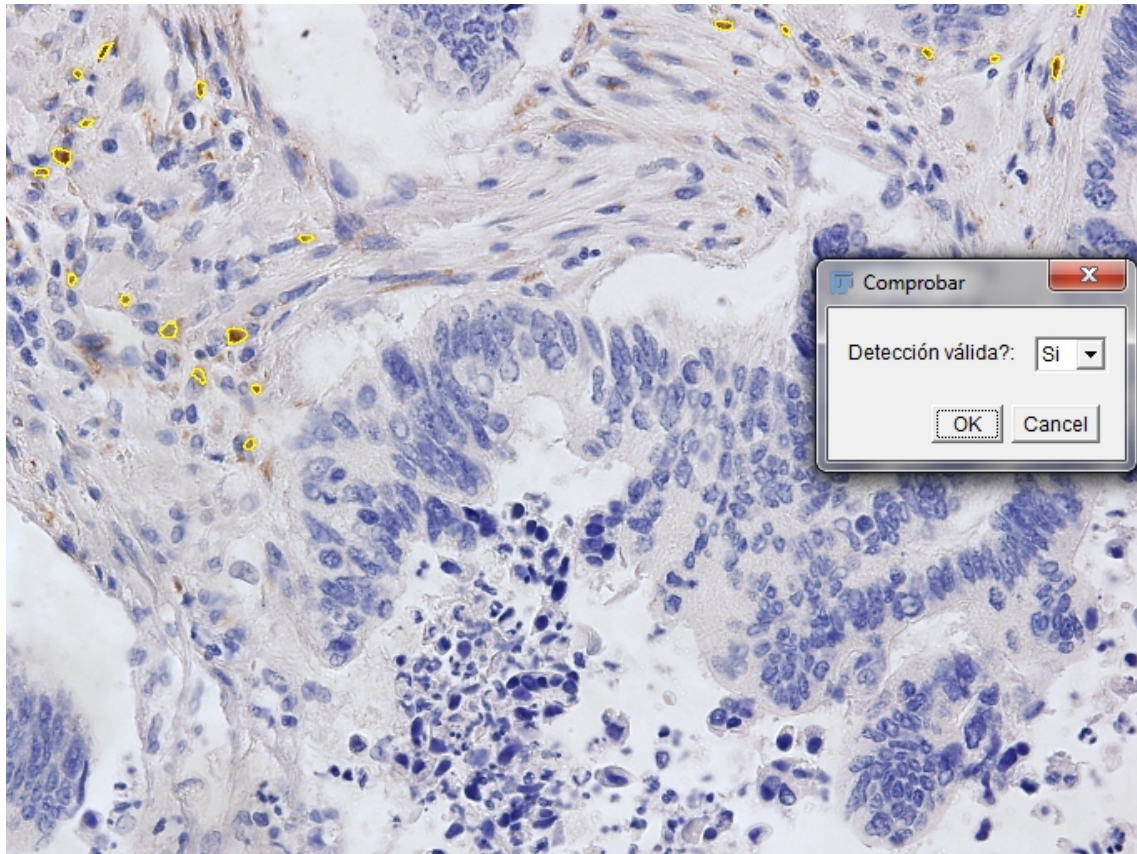
Por cada muestra debemos de crear un subdirectorio que nombraremos con la clave de la muestra, por ejemplo : 04b286G. En esta carpeta almacenaremos las imágenes anteriores para su posterior análisis. Comprimiremos la carpeta en un zip y la enviaremos al Sistema de Almacenamiento de Ficheros (SAF) desde donde la podemos descargar en cualquier ordenador para analizarla.

3. Análisis de imágenes.

Para el análisis de las imágenes utilizaremos el programa FIJI junto con la macro Med_Colageno2.ijm. Una vez arrancado el programa FIJI iremos a Plugins / Med Colageno2 y comenzará la ejecución de la macro.

NOTA. *Para calibrar la imagen en unidades reales la macro asume que las imágenes de medida del Colágeno están tomadas con el microscopio Olympus BX61 con un objetivo de 20x y un tamaño de imagen de 1360x1024 píxeles, y que el mosaico de imágenes de la matriz (Gomori) está formado por imágenes tomadas a 4x con un tamaño de imagen de 680 x 512 píxeles. Si esto no se cumpliese los valores en micras obtenidos no serían reales.*

Nos aparece un mensaje que pide que abramos la primera imagen de las células marcadas, pulsaremos OK , iremos al directorio donde tenemos las imágenes y seleccionaremos la primera de ellas y pulsamos “abrir”. A continuación nos pregunta por el número de imágenes de la serie. Teclaremos el número de campos que hemos tomado para medir el valor de células marcadas con Colágeno. El programa empezará a analizar cada una de las imágenes tomadas para medir el área marcada. Para la detección de Colágeno se utiliza el plugin “Colour Deconvolution” realizado por Gabriel Landini (1) basado en el método descrito por Ruifrok, A.C. & Johnston, D.A. (2). El resultado de la detección se puede ver en la siguiente imagen.



De las áreas marcadas se mide el número de células y el área total del marcaje.

El programa mide también el número y el área de células no marcadas.

Al finalizar cada medida el programa pregunta si estamos de acuerdo con la detección realizada. Si la detección no es correcta podemos borrar los datos medidos en esta imagen, para ello vamos a la ventana “Summary”, seleccionamos las dos últimas líneas y pulsamos Edit/Clear. De este modo los datos de la imagen no se tendrán en cuenta en el cálculo total.

Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area
04b28601.tif	2	10.42	5.21	0.01
04b28602.tif-tot	1160	24673.85	21.27	17.17
04b28602.tif	21	219.43	10.45	0.15
04b28603.tif-tot	1021	25825.27	25.29	17.98
04b28603.tif	4	59.73	14.93	0.04
04b28604.tif-tot	1060	21918.74	20.68	15.26
04b28604.tif	0	0.00	NaN	0.00
04b28605.tif-tot	1246	24964.56	20.04	17.38
04b28605.tif	27	271.74	10.06	0.19

Una vez terminadas de medir las imágenes con colágeno el programa pide que abramos la imagen de la matriz. Utilizando el mismo plugin de Color Deconvolution, ajustado para el marcaje del Gomori en verde, nos detecta el área de matriz. A continuación el programa detecta el área de tejido en la imagen y nos pregunta si la detección es correcta. En caso de que no lo fuese podemos utilizar el ratón para bordear las zonas que no pertenecen al tejido y eliminarlas. Finalmente el programa mide el área de matriz y el área total de tejido.

Al finalizar nos pregunta si queremos medir una nueva muestra o finalizar. Los resultados de todo el proceso se muestran en la ventana de resultados.

Nombre de la muestra	Ncampos	AreaTejido	Ncel-tot	Ncel-Colag	Areacel-tot	Areacel-Colag	%Ncel-Colag	%Areacel-Colag	%Areatejido-Colag	Area-refGomori	Area-Gomori	%Gomori
04b286	29	4166458.12	27712	975	546647.14	10464.3	3.5183	1.9143	0.2512	131696254	32227019.8	24.4707

Los valores corresponden a lo siguiente:

Nombre de la muestra: Nombre o clave del caso de estudio.

Ncampos: N° de imágenes por muestra analizadas para la medida del Colágeno.

AreaTejido: Área de la muestra analizada para la medida del Colágeno (suma de las áreas de todas las imágenes analizadas).

Ncel-tot: N° de células totales en la muestra analizada (marcadas y no marcadas)

Ncel-Colag: N° de células marcadas con Colágeno en la muestra analizada.

Areacel-tot: Área ocupada por las células (marcadas y no marcadas) en la muestra.

AreaCel-Colag: Área ocupada por las células con Colágeno.

%Ncel-Colag: Porcentaje de número de células marcadas frente al n° total de células.

%Areacel-Colag: Porcentaje de área de células con Colágeno frente al área total de células.

%Areatejido-Colag: Porcentaje de área de células con Colágeno frente al área total de muestra analizada.

Area-refGomori: Área de tejido analizado para la medida de Gomori.

Area-Gomori: Área de tejido marcada con Gomori.

%Gomori: Porcentaje de tejido marcado con Gomori

%Colag/Gomori: Relación entre el área de colágeno y el área de Gomori (multiplicado por 100)

Todos valores están en micras.

Referencias.

(1) Gabriel Landini . *Colour Deconvolution* . <http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>

(2) Ruifrok, A.C. & Johnston, D.A. (2001), "[Quantification of histochemical staining by color deconvolution](#)", *Anal. Quant. Cytol. Histol.***23**: 291-299, [PMID 11531144](#)

ANEXO 3: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

CIRUGÍA GENERAL **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA RESECCIÓN SEGMENTARIA DE COLON**

Nombre del paciente:

Número de historia:

Nombre del médico que le informa:

Fecha:

En qué consiste

Mediante este procedimiento se pretende extirpar la parte del intestino que está enfermo, evitando las complicaciones derivadas del mismo (sangrado, perforación, obstrucción, fistula...) que precisarían intervención urgente.

Se va a extirpar la parte del intestino grueso que está enfermo, para posteriormente suturarlo y restaurar la continuidad del tubo digestivo. En ocasiones puede ser necesario ampliar la extirpación a otros órganos y, a veces, por cuestiones técnicas hay que realizar un ano artificial que, en la mayoría de los casos, es provisional.

El procedimiento requiere la administración de anestesia y es posible que durante o después de la intervención sea necesaria la utilización de sangre y/o hemoderivados, de cuyos riesgos informarán los servicios de anestesia y de hematología.

La realización del procedimiento puede ser filmada con fines científicos o didácticos, salvo que usted manifieste lo contrario.

También cabe la posibilidad que durante la cirugía haya que realizar modificaciones del procedimiento por los hallazgos intraoperatorios para proporcionar el tratamiento más adecuado.

Riesgos típicos

A pesar de la adecuada elección de la técnica y de su correcta realización pueden presentarse efectos indeseables, tanto los comunes derivados de toda intervención y que pueden afectar a todos los órganos y sistemas, como otros específicos del procedimiento; poco graves y frecuentes: infección o sangrado de la herida, retención aguda de orina, flebitis, aumento del número de deposiciones, dolor prolongado en la zona de la operación, o poco frecuentes y graves: dehiscencia de la laparotomía (apertura de la herida). Fistula de la anastomosis por alteración en la cicatrización que en la mayoría de los casos se resuelve con tratamiento médico (medicamentos, sueros, etc.), pero que a veces precisa intervención con la realización de un ano artificial. Sangrado o infección intraabdominal. Obstrucción intestinal. Reproducción de la enfermedad.

Estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico (medicamentos, sueros, etc.), pero pueden llegar a requerir una reintervención, generalmente de urgencia, incluyendo un riesgo mínimo de mortalidad.

Para la realización de ésta técnica puede ser necesaria una preparación previa, en ocasiones con peculiaridades como(aunque puede ser posible su realización sin una preparación completa).

Es necesario que advierta al equipo médico de la existencia de posibles alergias medicamentosas, alteraciones de la coagulación, enfermedades cardiopulmonares, existencia de prótesis, marcapasos, medicaciones actuales o cualquier otra circunstancia.

Riesgos personalizados

-
-

Alternativas posibles

En su caso no existe una alternativa eficaz de tratamiento.

Declaro que he sido informado por el médico de los riesgos del procedimiento, que me han explicado las posibles alternativas y que sé que, en cualquier momento, puedo revocar mi consentimiento.

Estoy **satisfecho/a** con la información recibida, he podido formular toda clase de preguntas que he creído conveniente y me han aclarado todas las dudas planteadas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para la realización del procedimiento.

Firma del paciente

Firma del médico

Nombre del representante legal en caso de incapacidad del paciente, con indicación del carácter con el que interviene (padre, madre, tutor, etc.).

Nombre del representante legal

*Firma
D.N.I.*

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con fecha revoco el consentimiento prestado para la realización del procedimiento.

Firma del paciente

Firma del médico

Nombre del representante legal en caso de incapacidad de la paciente, con indicación del carácter con el que interviene (esposo, padre, madre, tutor, etc)

Nombre del representante legal

*Firma del representante legal
D.N.I.*



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BIOBANCO

Consentimiento de Donación Voluntaria de tejido sobrante de intervención quirúrgica o prueba diagnóstica y/o sangre periférica para ser recogidos por el Biobanco del Principado de Asturias.

Nombre de el/la paciente:

Nº de Historia Clínica

Nombre del médico que le informa:

Fecha:

En qué consiste:

El Biobanco del Principado de Asturias tiene la finalidad de recoger y conservar muestras biológicas humanas en condiciones adecuadas de seguridad y trazabilidad, que serán utilizadas para proyectos de investigación que hayan sido aprobados por el Comité Ético y el Comité Científico.

Durante la intervención quirúrgica o prueba diagnóstica a la que va a ser sometido se tomarán muestras de sus tejidos. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente el tejido SOBRENTE, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

Si lo autoriza, también se le tomará un pequeño volumen de sangre (aprox. 10 mL) para su almacenamiento en el Biobanco y su posible uso en investigación.

Privacidad de la información y protección de los intereses del paciente:

Las muestras donadas se almacenarán en el Biobanco del Principado de Asturias, que cumple con los requerimientos establecidos por la normativa vigente (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y Ley de Investigación Biomédica LIB 14/2007).

Los datos personales serán disociados de las muestras mediante un sistema de codificación. Asimismo, usted podrá ejecutar los derechos de acceso, rectificación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, y de revocación del consentimiento. Para ello deberá ponerse en contacto con el personal responsable de la Base de Datos del Biobanco.

Usted tiene derecho a disponer de la información sobre el uso concreto que se ha dado a las muestras, en qué proyectos de investigación se han usado y quién es el investigador principal.

La decisión de permitir utilizar las muestras para fines de investigación es totalmente voluntaria por su parte. Su decisión, sea cual fuere, no comportará penalización alguna, ni afectará en ningún modo a los cuidados médicos y a la asistencia que usted pueda necesitar en el futuro.

Beneficios esperados:

No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Las muestras no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

Riesgos típicos:

Toma de muestra: el procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido, puesto que se trata de material sobrante de la intervención. La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios: lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción, que desaparecerán trascurridos 1 o 2 días.

Riesgos personalizados:

Biobanco del Principado de Asturias. Hospital Universitario Central de Asturias, C/Celestino Villamil s/n, 33006 Oviedo, Principado de Asturias. Telf: 985109817, ext. 39817, e-mail: pabloim@ficyt.es

DECLARACIONES Y FIRMAS

1. Declaración del donante

Declaro que he sido informado

- Sobre las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma codificada a los investigadores.
- Que en cualquier momento puedo revocar el consentimiento y solicitar la eliminación de todos mis datos personales y las muestras que permanezcan almacenadas en el Biobanco. Esta eliminación no se extenderá a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Consiento:

- En donar voluntariamente: (marcar con una X lo que proceda)
 - Mis tejidos excedentes
 - Una muestra adicional de sangre
- Que el Biobanco del Principado de Asturias u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras para investigaciones biosanitarias, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.
- Yo, mi representante Legal o Tutor, accedo (marcar sí o no) a que el personal del Biobanco del Principado de Asturias me contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos y/o tomar nuevas muestras.
 - Sí
 - No
- Yo, mi representante Legal o Tutor, deseo (marcar sí o no) ser informado de los posibles hallazgos genéticos de relevancia clínica para mí y/o mi familia.
 - Sí
 - No

IDENTIFICACIÓN DEL DONANTE

D/Dña.....de.....años de edad
DNI.....Domicilio:.....
Población:.....Provincia:.....
CP:Teléfono:.....e-mail:.....
Firma

IDENTIFICACIÓN DEL REPRESENTANTE (en caso de minoría legal o discapacidad del donante)

D/Dña.....de.....años de edad
DNI.....Domicilio:.....
Población:.....Provincia:.....
CP:Teléfono:.....e-mail:.....
Firma

2. Declaración del profesional de salud:

He informado debidamente al donante,

Fdo.: Dr/a.....Colegiado/a nº.....

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con fecha.....revoco el consentimiento prestado,
por lo que las muestras almacenadas deben ser destruidas.

Donante

D./Dña..... de..... años de edad
y con DNI.....
Firma

Representante legal o Tutor (en caso de minoría legal o discapacidad del donante)

D./Dña..... de..... años de edad,
en calidad de Representante Legal o Tutor y con DNI.....
Firma

Profesional de la salud:

Fdo.: Dr/a..... Colegiado/a nº.....

ANEXO 4: TABLAS SUPLEMENTARIAS

TABLA S1. CRECIMIENTO DE CULTIVO DE FIBROBLASTOS

	GRUPO	CASO	TIEMPO (días)	N.º CÉLULAS (Media de dos determinaciones)	IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE
1	NF	1	0	10000	34
2	NF	1	2	27500	34
3	NF	1	4	41250	34
4	NF	1	6	96000	34
5	NF	1	8	120000	34
6	NF	1	10	135000	34
7	NF	1	12	117500	34
8	NF	2	0	10000	40
9	NF	2	2	22500	40
10	NF	2	4	42500	40
11	NF	2	6	48750	40
12	NF	2	8	60000	40
13	NF	2	10	58750	40
14	NF	2	12	63750	40
15	NF	3	0	10000	49
16	NF	3	2	17500	49
17	NF	3	4	21250	49
18	NF	3	6	31250	49
19	NF	3	8	46250	49
20	NF	3	10	51250	49

21	NF	3	12	55000	49
22	CAF	4	0	10000	34
23	CAF	4	2	41000	34
24	CAF	4	4	121000	34
25	CAF	4	6	325000	34
26	CAF	4	8	400000	34
27	CAF	4	10	525000	34
28	CAF	4	12	340000	34
29	CAF	5	0	10000	40
30	CAF	5	2	110000	40
31	CAF	5	4	98750	40
32	CAF	5	6	126250	40
33	CAF	5	8	220000	40
34	CAF	5	10	255000	40
35	CAF	5	12	271500	40
36	CAF	6	0	10000	49
37	CAF	6	2	31125	49
38	CAF	6	4	41250	49
39	CAF	6	6	50250	49
40	CAF	6	8	106500	49
41	CAF	6	10	122500	49
42	CAF	6	12	157500	49

Tabla Suplementaria 1. Crecimiento de cultivos de fibroblastos. Datos de crecimiento de doce días de fibroblastos humanos normales (NF) y fibroblastos peritumorales (CAFs), obtenidos de tres pacientes con adenocarcinoma de colon.

TABLA S2. RESULTADO DE LOS XENOTRASPLANTES HT-29

Nº	CÉLULAS	PESO RATÓN	VOLUMEN (mm ³)	METÁSTASIS	ÓRGANO	DIAGNÓSTICO
RH1	1,5 millones HT-29	19,5	91,61	6mtx hepáticas 1foco ID mtx pulmonares	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 8.700 X 4.500 µm Desmoplasia: muy leve
					PÁNCREAS	4 focos de carcinoma poco diferenciado, con necrosis focal Infiltración de capa submucosa de estómago
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I. DELGADO	1 foco de infiltración de capa muscular por carcinoma bien diferenciado
					HÍGADO	3 metástasis pequeñas 1 metástasis grande en relación a zona diafragmática 1 metástasis grande en zona adyacente a vesícula biliar 1 metástasis grande en zona de hilio
					PULMONES	2 metástasis pequeñas 3 micrometástasis
					RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
RH2	1,5 millones HT-29	23,68	3,67	1mtx hepática	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 2421,70X 1711,43 µm Desmoplasia: muy leve
					PÁNCREAS	3 focos de carcinoma poco diferenciado Infiltración de capa muscular externa de estómago
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I. DELGADO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					HÍGADO	1 metástasis pequeña
					PULMONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
					RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral

Tabla Suplementaria 2. Resumen de los resultados anatomopatológicos de los trasplantes HT-29.

TABLA S3. RESULTADO DE LOS XENOTRASPLANTES HT-29 + NF

Nº	CÉLULAS	PESO RATÓN	VOLUMEN (mm ³)	METÁSTASIS	ÓRGANO	DIAGNÓSTICO
RHFN 1	1,5 millones HT-29 + NF	25,13	65,34	5mtx hepáticas 1foco en ID	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: de moderado a poco diferenciado Tamaño máximo: 6533,28 X 4393,70 µm Desmoplasia: leve-moderada
					PÁNCREAS	3 focos de adenocarcinoma de moderado a pobremente diferenciado
					ESTÓMAGO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta muscular interna 1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta mucosa
					DUODENO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.DELGADO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta mucosa
					I.GRUESO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					HÍGADO	1 metástasis grande 3 metástasis medianas 1 metástasis pequeña
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					PULMONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
RHFN 2	1,5 millones HT-29 + 150.000 NF	25,8	239,57	2mtx hepáticas múltiples mtx pulmonares mtx bazo, ID, Igrueso, riñón	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: de moderado a poco diferenciado Tamaño máximo: 11045,64 X 6463,14 µm Desmoplasia: moderada
					PÁNCREAS	1 foco de adenocarcinoma de moderado a pobremente diferenciado
					ESTÓMAGO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta muscular externa
					DUODENO	No se reconoce tejido histológicamente compatible con duodeno
					I.DELGADO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta muscular externa 1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta submucosa
					I.GRUESO	3 focos pobremente diferenciado infiltrando hasta muscular externa
					HÍGADO	2 metástasis grandes
					BAZO	Múltiples focos pobremente diferenciados infiltrando cápsula esplénica
					PULMONES	Múltiples focos pobremente diferenciados
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					RIÑONES	1 foco pobremente diferenciado infiltrando cápsula renal

RHFN 3	1,5 millones HT-29 + 150.000 NF	22,43	28,2	4mtx hepáticas 1foco ID	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 6545,90 X 2882,11 µm Desmoplasia: moderada
					PÁNCREAS	1 foco de adenocarcinoma pobremente diferenciado
					ESTÓMAGO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta mucosa
					DUODENO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.DELGADO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta muscular externa
					I.GRUESO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					HÍGADO	1 metástasis grande 1 metástasis mediana 2 metástasis pequeñas
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					PULMONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
					RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
					RHFN 4	1,5 millones HT-29 + 150.000 NF
PÁNCREAS	1 foco de adenocarcinoma pobremente diferenciado					
ESTÓMAGO	3 focos pobremente diferenciados infiltrando hasta muscular externa					
DUODENO	Sin evidencia de infiltración tumoral					
I..DELGADO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta muscular externa					
I.GRUESO	Sin evidencia de infiltración tumoral					
HÍGADO	1 metástasis mediana 2 metástasis pequeñas					
BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral					
PULMONES	Sin evidencia de infiltración tumoral					
CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral					
RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral					

Tabla Suplementaria 3. Resumen de los resultados anatomopatológicos de los trasplantes HT-29 + NF.

TABLA S4. RESULTADO DE LOS XENOTRASPLANTES HT-29 + CAFs

Nº	CÉLULAS	PESO RATÓN	VOLUMEN (mm ³)	METÁSTASIS	ÓRGANO	DIAGNÓSTICO
RHF1	1,5 millones HT-29 + 150.000 CAFs	25,5	76,86	9mtx hepáticas mtx pulmonars	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 7.300 X 4.500 µm Desmoplasia: leve
					PÁNCREAS	1 foco de carcinoma poco diferenciado con necrosis Infiltración de capa submucosa de estómago
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.DELGADO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					HÍGADO	4 metástasis pequeñas 4 metástasis medianas 1 metástasis grande
					PULMONES	1 metástasis pequeña 1 metástasis mediana
RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral					
RHF2	1,5 millones HT-29 + 150.000 CAFs	26,2	-	-	TUMOR	No
					PÁNCREAS	Sin evidencia de infiltración tumoral
					ESTÓMAGO	-
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.DELGADO	-
					I.GRUESO	-
					HÍGADO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					PULMONES	-
RIÑONES	-					
RHF3	1,5 millones HT-29 + 150.000 CAFs	26,6	563,16	7mtx hepáticas mtx pulmonar	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 12.000 X 9.500 µm Desmoplasia: leve-moderada
					PÁNCREAS	1 foco de carcinoma poco diferenciado
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.DELGADO	Pequeños nidos de infiltración en capa serosa
					HÍGADO	3 metástasis pequeñas 1 metástasis mediana 3 metástasis grande
					PULMONES	1 metástasis pequeña
RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral					
RHF4	1,5 millones HT-29 +	24,75	154,8	2mtx hepáticas Focos en ID infiltrac pared	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 9.700,00 X 5.542,30 µm

	150.000 CAFs					Desmoplasia: leve
					PÁNCREAS	1 foco de carcinoma poco diferenciado con focos de necrosis Infiltración de capa submucosa de estómago
					CORAZÓN	-
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.DELGADO	Infiltración de capa mucosa por carcinoma poco diferenciado
					HÍGADO	2 metástasis grandes
					PULMONES	-
					RIÑONES	-
					METÁSTASIS	Infiltración cutánea de dermis, grasa subcutánea y capa muscular por carcinoma poco diferenciado, con múltiples focos de invasión vascular de tipo linfático.
RHF5	1,5 millones HT-29 + 150.000 CAFs	27	93,73	11mtx hepáticas mtx pulmonares	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 6.778,11 X5.166,35 µm Desmoplasia: leve-moderada
					PÁNCREAS	1 foco de carcinoma poco diferenciado con necrosis Infiltración de capa mucosa de estómago por nidos de carcinoma poco diferenciado
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.DELGADO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					HÍGADO	9 metástasis pequeñas 1 metástasis medianas 1 metástasis grandes
					PULMONES	3 metástasis pequeñas 1 micrometástasis
					RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
RHF6	1,5 millones HT-29 + 150.000 CAFs	25,8	169,88	5mtx hepáticas mtx esplénicas foc en ID infiltrac pared	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 10.800 X 5.500 µm Desmoplasia: leve-moderada
					PÁNCREAS	2 focos de carcinoma poco diferenciado con necrosis Infiltración de capa submucosa de estómago por carcinoma poco diferenciado
					CORAZÓN	-
					BAZO	4 focos de infiltración por carcinoma poco diferenciado
					I.DELGADO	Infiltración de capa submucosa por carcinoma poco diferenciado
					HÍGADO	2 metástasis pequeñas 1 metástasis mediana 2 metástasis grandes
					PULMONES	-
					RIÑONES	-
					METASTASIS	Infiltración cutánea de dermis, grasa subcutánea y capa

						muscular por carcinoma poco diferenciado, con múltiples focos de invasión vascular de tipo linfático.
RHF7	1,5 millones HT-29 + 150.000 CAFs	23,06	207,03	3mtx hepáticas	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: de moderado a poco diferenciado Tamaño máximo: 6825,90 X 8560,89 µm Desmoplasia: moderada
					PÁNCREAS	2 focos de adenocarcinoma de moderado a pobremente diferenciado
					ESTÓMAGO	3 focos pobremente diferenciados infiltrando hasta muscular externa 2 focos pobremente diferenciados infiltrando hasta submucosa
					DUODENO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.DELGADO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I.GRUESO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					HÍGADO	3 metástasis grandes
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					PULMONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral
RHF8	1,5 millones HT-29 + 150.000 CAFs	25,01	143,92	6mtx hepáticas 7mtx pulmonares focos en ID	TUMOR	Tipo tumoral: carcinoma Grado de diferenciación: poco diferenciado Tamaño máximo: 9674,22 X 5358,74 µm Desmoplasia: leve-moderada
					PÁNCREAS	1 foco de adenocarcinoma pobremente diferenciado
					ESTÓMAGO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta submucosa
					DUODENO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					I..DELGADO	1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta mucosa 1 foco pobremente diferenciado infiltrando hasta muscular externa
					I.GRUESO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					HÍGADO	1 metástasis grande 1 metástasis mediana 4 metástasis pequeñas
					BAZO	Sin evidencia de infiltración tumoral
					PULMONES	7 pequeños focos de carcinoma pobremente diferenciado
					CORAZÓN	Sin evidencia de infiltración tumoral
					RIÑONES	Sin evidencia de infiltración tumoral

Tabla Suplementaria 4. Resumen de los resultados anatomopatológicos de los trasplantes HT-29 + CAFs.