

# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **HISTOLOGÍA**

**PAPEL DE LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS  
AL CÁNCER EN LA PROGRESIÓN Y  
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE COLON**

**[Role of Cancer-associated fibroblasts in the  
progression and treatment of colon cancer]**

**Autor:** Latorre Chueca, Idoya.

**Director:** Ochoa Garrido, Ignacio.

# ÍNDICE:

1. <u>Listado de figuras, esquemas y tablas</u> .....	4
2. <u>Listado de abreviaturas</u> .....	5
3. <u>Resúmenes, palabras clave</u> .....	7
3.1. Resumen en castellano.....	7
3.2. Resumen en inglés.....	8
3.3. Palabras clave.....	8
4. <u>Introducción al trabajo</u> .....	9
5. <u>Descripción del colon</u> .....	9
5.1. Descripción anatómica del colon.....	9
5.2. Desarrollo embriológico del colon.....	10
5.3. Descripción histológica del colon.....	12
6. <u>Cáncer de colon</u> .....	15
6.1. Epidemiología.....	16
6.2. Características.....	16
6.3. Pronóstico.....	17
6.4. Patogenia.....	18
6.5. Descripción del microentorno tumoral del cáncer de colon. Anatomía patológica.....	19
7. <u>Influencia de los CAFs en la respuesta al tratamiento del cáncer de colon</u> .....	22
7.1. Características diferenciales de los CAFs.....	23
7.2. Diferentes hipótesis sobre el posible origen de los CAFs.....	25
7.3. Señales involucradas en el reclutamiento y diferenciación de los CAFs.....	27
7.4. Papel de los fibroblastos asociados al cáncer en la progresión tumoral.....	28
7.4.1. Los CAFs apoyan el crecimiento del tumor primario.....	28

7.4.2. Los CAFs apoyan la invasión y metástasis tumoral.....	33
7.4.3. Otros mecanismos mediante los cuales los CAFs favorecen la progresión y la invasión tumoral.....	36
7.5. Terapias específicas frente a los CAFs.....	38
8. <u>Conclusiones</u> .....	42
9. <u>Referencias</u> .....	44
10. <u>Anexos</u> .....	47

# 1. Listado de figuras, esquemas y tablas.

Figura 1. Partes del intestino grueso.....	10
Figura 2. Secciones sagitales de embriones en diversas fases del desarrollo que muestran el efecto del plegamiento cefalocaudal y lateral del embrión.....	11
Figura 3. Diagrama de las características histológicas del colon.....	12
Figura 4. Estructura histológica general de la pared del colon.....	13
Figura 5. Corte longitudinal de mucosa de colon.....	14
Figura 6. Corte oblicuo del epitelio de una cripta de Lieberkühn.....	14
Figura 7. Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer según la localización y el sexo, en Estados Unidos en el año 2010.....	16
Figura 8. Cambios morfológicos y moleculares en la secuencia adenoma-carcinoma (vía supresora o de inestabilidad cromosómica).....	19
Figura 9. Cambios morfológicos y moleculares en la vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites.....	19
Figura 10. Representación del microentorno tumoral.....	20
Figura 11. Aspecto histológico del adenocarcinoma de colon.....	21
Figura 12. Aspecto histológico de los diferentes tipos de adenocarcinoma colorrectal.....	22
Figura 13. Representación de los elementos del microentorno tumoral, y de la manera en la que influyen en la tumorogénesis.....	23
Figura 14. Micrografías comparativas de fibroblastos en diferentes estados de activación.....	24
Figura 15. Posibles orígenes de los CAFs.....	27
Figura 16. Características que presenta el cáncer regulado por CAFs.....	28
Figura 17. Retroalimentación de TGF- $\beta$ debido a la insensibilidad del receptor en el epitelio tumoral.....	30
Figura 18. La interacción entre los CAFs y las células tumorales.....	37
Figura 19. El nicho de células madre y otros tipos celulares circundantes.....	38
Figura 20. Mecanismos para adquirir las características del cáncer.....	38
Figura 21. Objetivo terapéutico de las características del cáncer.....	41

## 2. Listado de abreviaturas.

- $\alpha$ -SMA: Actina  $\alpha$  de músculo liso.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- bFGF ó FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.
- CAFs: Fibroblastos asociados al cáncer.
- CEA: Antígeno carcinoembrionario.
- CIMP: Fenotipo metilador de las islas CpG.
- CPE: Precursores de células endoteliales.
- CXCR4: Receptor tipo 4 de la quimiocina C-X-C.
- ECM: Matriz extracelular.
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico.
- EGFR: Receptor de EGF (factor de crecimiento epidérmico).
- ET3: Endotelina 3.
- FAP: Proteína de activación de fibroblastos.
- FGF ó bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.
- FSP-1 ó S100A4: Proteína específica de fibroblastos 1.
- GM-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos.
- H-E: Tinción hematoxilina – eosina.
- HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos.
- HIF1 $\alpha$ : Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$ .
- IFP: Presión intersticial del fluido.
- IGF I y II: Factores I y II de crecimiento insulínico.
- IL: Interleucina (6, 8...).
- LDH5: Lactato deshidrogenasa-5.
- MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas.
- ME: Microscopía electrónica.
- MMPs: Metaloproteinasas de matriz (1, 2, 3...).
- MO: Microscopía óptica.

- PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PDGFR  $\alpha$  /  $\beta$ : Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\alpha$  /  $\beta$ .
- SDF1: Factor 1 derivado de células estromales.
- TAMs: Macrófagos asociados a tumores.
- TBRII: Receptor TGF- $\beta$  de tipo II.
- TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformado beta.
- TGF $\beta$ R1: Receptor tipo 1 de TGF $\beta$ .
- TIMP: Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.
- TKI: Inhibidor de la tirosina quinasa VEGFR.
- TNC: Glicoproteína tenascina-C.
- uPA: Activador de plasminógeno del tipo urocinasa.
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

### **3. Resúmenes. Palabras clave.**

#### **3.1. Resumen en castellano.**

El cáncer colorrectal es uno de los tumores malignos más prevalentes y mortales en los países occidentales. Y a pesar de que recientes mejoras en la cirugía y la quimioterapia han aumentado la supervivencia de estos pacientes, la tasa global de supervivencia a los 5 años es del 64,3%, mientras que la de los pacientes con estadios más avanzados es sólo de un 11,7%. Estos datos hacen necesario el desarrollo de nuevas estrategias, y la participación del microentorno tumoral en el desarrollo de resistencias ha adquirido una gran importancia en los últimos años.

La progresión tumoral y posterior invasión metastásica requieren la conjunta evolución de las células tumorales con el microentorno, el cual está formado por múltiples elementos como células no transformadas, matriz extracelular modificada, una mayor densidad de vasos, células inflamatorias y del sistema inmune y fibroblastos con un fenotipo "activado", los denominados fibroblastos asociados al cáncer o CAFs, de manera que todos ellos participan activamente.

Estos CAFs tienen un origen heterogéneo y todavía no bien descrito, ya que pueden provenir de fibroblastos normales que se han transformado por la acción de moléculas exógenas o alteraciones genéticas; de las células endoteliales a través de una transdiferenciación; de las propias células epiteliales tumorales a través de una transición epitelio-mesenquimal; o de las células mesenquimales procedentes de la médula ósea. Pero todavía no se conoce con certeza.

Y aunque sus mecanismos de acción aún no son del todo conocidos, cada vez se sabe un poco más. Además de actuar de diferentes formas, lo hacen con diferentes fines, es decir, no sólo promueven el crecimiento del tumor, sino que también facilitan la invasión de las estructuras vecinas, favoreciendo la producción de metástasis, todo ello mediante la secreción de diferentes factores como el factor de crecimiento transformado beta (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o citoquinas inflamatorias, interviniendo en sus vías metabólicas, modificando la composición de la matriz extracelular, e incluso de manera indirecta, promoviendo la angiogénesis, la inmunosupresión o el desarrollo de nichos que dificultan la llegada de los fármacos. Por eso, el futuro se halla en la investigación de los CAFs y el desarrollo de nuevas estrategias frente a alguna de sus múltiples formas de participar en la tumorogénesis, en cualquier etapa del proceso.

### **3.2. Resumen en inglés.**

Colorectal cancer is one of the most prevalent and deadly malignant tumors in Western countries. And although recent improvements in treatments have increased the survival of these patients, the overall survival rate at 5 years is 64.3%, while that of stage IV patients is only 11.7%. Therefore, the development of new strategies is necessary, and in recent years the participation of the tumor microenvironment in the development of drug resistance has acquired great importance.

Tumor progression and subsequent metastatic invasion require the joint evolution of tumor cells with the microenvironment, which consists of multiple elements such as untransformed cells, modified extracellular matrix, increased vessel density, inflammatory cells, immune cells and fibroblasts with an "activated" phenotype, the so-called cancer-associated fibroblasts or CAFs, so that they are all actively involved.

These CAFs have a heterogeneous origin. They could proceed from normal fibroblasts that have been transformed by the action of exogenous molecules or genetic alterations; from endothelial cells through an endothelial-mesenchymal transition; from tumoral epithelial cells themselves through an epithelial-mesenchymal transition; or from mesenchymal cells from the bone marrow. It is not yet known.

And although their mechanisms of action are not yet fully known, we know a little more each time. In addition to acting in different ways, they do so for different purposes, that is, not only promote the growth of the tumor, but also facilitate the invasion of adjacent structures, favoring the development of metastasis, all by secreting different factors such as transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), platelet derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF) or inflammatory cytokines, intervening in their metabolic pathways, modifying the composition of the extracellular matrix, and even indirectly, promoting angiogenesis, immunosuppression or the creation of niches that hinder the arrival of drugs. Therefore, the future lies in the investigation of CAFs and the development of new strategies against some of its multiple ways of participating in tumorogenesis, at any stage of the process.

### **3.3. Palabras clave.**

- Fibroblastos asociados al cáncer (CAFs).
- Cáncer de colon.
- Influencia.
- Respuesta al tratamiento.

## **4. Introducción.**

El cáncer colorrectal es uno de los tumores malignos más prevalentes y mortales tanto en España como en el resto de los países occidentales, a pesar de los recientes avances en su tratamiento.

Numerosos estudios han demostrado que la proliferación tumoral no se produce únicamente como consecuencia de alteraciones genéticas, sino que la participación del microentorno tumoral promoviendo tanto el crecimiento como la invasión y metástasis tumoral es clave. Por eso, se debe investigar más en conocer cómo este microentorno participa en el proceso e incluso en el desarrollo de resistencias a los tratamientos ya existentes, para lograr combatirlo. En este trabajo, se va a explicar con mayor detenimiento la manera en la que un elemento fundamental de este microentorno tumoral, los fibroblastos asociados al cáncer o CAFs, participan en la tumorogénesis del cáncer de colon.

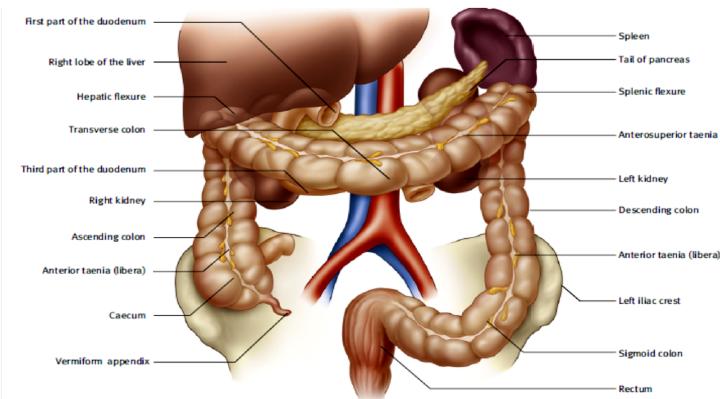
## **5. Descripción del colon.**

A pesar de ser un órgano muy conocido es importante recordar las características embriológicas y morfológicas del colon por las implicaciones que estas tienen en la aparición, progresión del cáncer y la respuesta a los diferentes tratamientos.

### **5.1. Descripción anatómica del colon.**

El intestino grueso es la parte final del tubo digestivo, responsable de la reabsorción de agua y electrolitos, de secretar una gran cantidad de moco que favorezca el tránsito, así como de almacenar y expulsar las heces al exterior. Se extiende desde la válvula ileocecal, a través de la cual se une al íleon (al intestino delgado), hasta el canal anal. Y aunque su longitud varía en cada sujeto, en promedio mide 1,5 m de longitud, y tiene un diámetro que desciende desde los 7,5 cm en ciego a los 4 cm en el ano. Se subdivide en diferentes regiones, aunque esta división es más descriptiva que anatómica: el ciego (con el apéndice vermiforme), el colon ascendente, el ángulo hepático, el colon transverso, el ángulo esplénico, el colon descendente, el colon sigmoide, el recto y el ano.<sup>[1][2]</sup>

El colon y el ciego presentan tres cintillas musculares lisas longitudinales o tenias, que constituyen un engrosamiento de la capa muscular externa; las cuales no aparecen ni en el apéndice ni en el recto, y de las que se desprenden pequeños acúmulos de grasa, los apéndices epiploicos. El colon presenta, además, unas abolladuras o haustras que le proporcionan su típica morfología saculada.<sup>[1][2]</sup>



**Figura 1. Partes del intestino grueso.**<sup>[1]</sup>

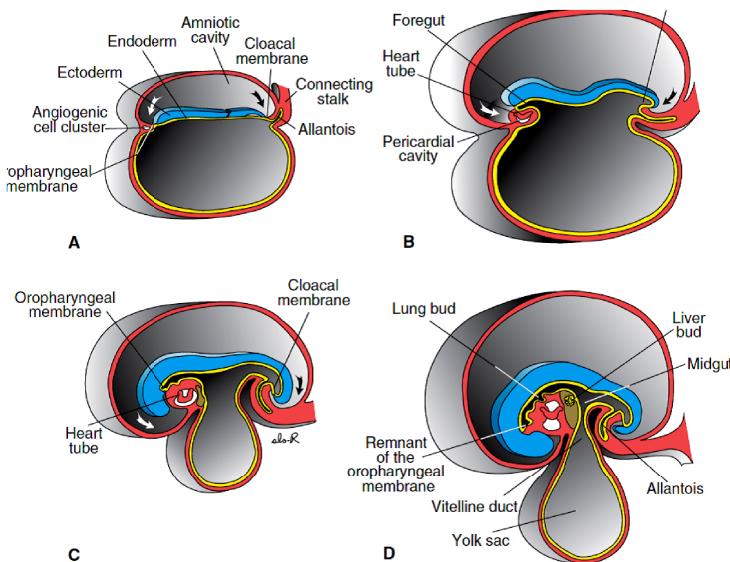
## 5.2. Desarrollo embriológico del colon.

### Desarrollo embriológico del tubo intestinal:

El embrión se pliega cefalocaudal y lateralmente, haciendo que una parte de la cavidad del saco vitelino revestida de endodermo se incorpore a él para formar el intestino primitivo. Mientras que otras dos partes de esta cavidad, el saco vitelino y el alantoides, permanecen fuera del embrión.<sup>[3]</sup>

El intestino primitivo forma un tubo con el extremo ciego, que se corresponde con el intestino anterior en la parte cefálica, y con el intestino posterior en la caudal. La parte central, el intestino medio, queda temporalmente conectada al saco vitelino a través del conducto vitelino o pedículo del saco vitelino. De manera que el desarrollo del intestino primitivo y de sus derivados generalmente se divide en cuatro apartados:

1. El intestino faríngeo o faringe procede del intestino anterior.
2. El resto del intestino anterior se dispone a continuación del tubo faríngeo, hasta la evaginación del hígado.
3. El intestino medio comprende desde la yema hepática hasta los dos tercios proximales del colon transverso.
4. El intestino posterior se extiende desde el tercio distal del colon transverso hasta la membrana cloacal.<sup>[3]</sup>



**Figura 2. Secciones sagitales de embriones en diversas fases del desarrollo que muestran el efecto del plegamientocefalocaudal y lateral del embrión.<sup>[3]</sup>**

#### Consecuencias clínicas:

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios que resaltan las diferencias clínicas existentes entre el adenocarcinoma localizado en el colon derecho y aquel que se localiza en el colon izquierdo.<sup>[4]</sup> Esto podría deberse a que los segmentos proximal y distal del colon tienen diferente origen embriológico:

- El segmento que se extiende desde el ciego hasta los dos tercios proximales del colon transverso (englobando ciego, colon ascendente, flexión hepática y colon transverso, lo que se corresponde con el colon derecho) deriva del intestino medio.<sup>[4]</sup>
- En cambio, el segmento que comprende desde el tercio distal del colon transverso hasta el canal anal superior (englobando flexura esplénica, el colon descendente y el colon sigmoide, lo que se corresponde con el colon izquierdo) deriva del intestino posterior.<sup>[4]</sup>

A principios de los años 90, Bufill propuso esta división, creyendo que además de las diferencias anatómicas, existen diferencias en la biología y fisiopatología tumoral que pueden determinar diferente susceptibilidad a carcinógenos ambientales, y que por tanto, requerirán diferentes métodos de detección y tratamiento. Algunos investigadores incluso afirman que los tumores situados en lado derecho e izquierdo son tan diferentes el uno del otro que pueden ser considerados como entidades distintas, pudiendo llegar a dividir el adenocarcinoma colorrectal en tres entidades distintas: cáncer de colon derecho, cáncer de colon izquierdo y cáncer rectal.<sup>[4]</sup>

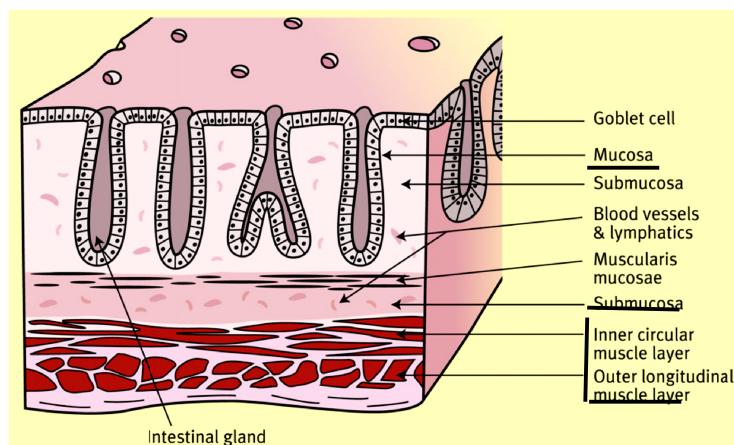
Se cree que en mujeres y ancianos, el tumor suele localizarse prioritariamente en el colon derecho, además de tener un mayor tamaño. Asimismo, también se han descrito diferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas y los lugares de metástasis. Konopke et al. encontraron que las metástasis de los tumores de colon derecho se localizan predominantemente en el lóbulo derecho del hígado, mientras que cuando el tumor se encuentra en el colon izquierdo, las metástasis ocupan ambos lóbulos hepáticos frecuentemente.<sup>[4]</sup>

Sin embargo, sigue siendo un tema a debate sobre el que no se ha hallado un consenso. Mientras Yahaqi et al. llegaron a la conclusión de que el cáncer de colon derecho e izquierdo tienen diferente pronóstico y por lo tanto, deben ser tratados como entidades diferentes<sup>[5]</sup>; Michal Mik et al. encontraron que las diferencias pueden deberse al hecho de que los pacientes hayan sido diagnosticados en diferentes etapas del desarrollo tumoral o a un incorrecto estadiaje.<sup>[4]</sup> Por lo que es necesario profundizar más en este tema.

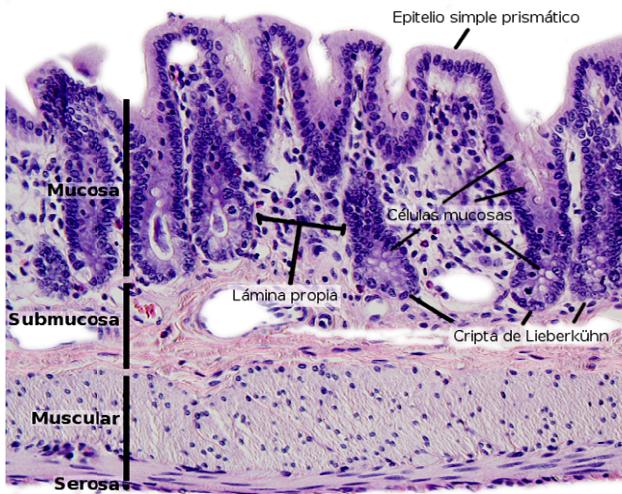
### **5.3. Descripción histológica del colon.**

Para entender mejor la progresión de este tumor y la relevancia del entorno es necesario recordar también las características histológicas normales de este órgano. Para ver qué elementos son los que se afectan y de qué manera lo hacen.

El intestino grueso no presenta vellosidades ni pliegues circulares. Al igual que el resto del tracto digestivo, la pared del intestino grueso, del colon en nuestro caso, se puede dividir en cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa.<sup>[1] [6] [7]</sup>



**Figura 3. Diagrama de las características histológicas del colon.** Se observan las cuatro capas de la pared del colon: mucosa, submucosa, muscular y serosa.<sup>[1]</sup>



**Figura 4. Estructura histológica general de la pared del colon. MO, H-E, x10.** Se observan las cuatro capas de la pared del colon: mucosa, submucosa, muscular y serosa.<sup>[8]</sup>

La **capa mucosa** está formada por tres capas: un epitelio de revestimiento, la lámina propia y la muscular de la mucosa.<sup>[6] [7]</sup>

El epitelio de revestimiento del colon es un epitelio simple cilíndrico y se continúa con numerosas glándulas mucosas tubulares densamente agrupadas, denominadas criptas de Lieberkühn. Estas glándulas aparecen como invaginaciones de la superficie epitelial que se extienden por todo el espesor de la mucosa, aumentando el área de la célula para facilitar la absorción de iones y agua. En ellas se encuentran las células mucosas o caliciformes, localizadas mayoritariamente en la base de las glándulas, y las células absorbivas, que predominan en la superficie luminal. Las células mucosas son más abundantes en el epitelio del intestino grueso que en el del intestino delgado, de manera que la proporción entre células absorbivas y células mucosas, varía de 4:1 en las porciones más próximas al intestino delgado, a 1:1 en las zonas más próximas al ano. También podemos encontrar folículos linfáticos aislados. En la mayoría de los casos, la proliferación tumoral se inicia en el epitelio glandular, dando lugar a un adenocarcinoma de lento crecimiento. La presencia de diferentes tipos celulares es importante, puesto que luego darán lugar a diferentes subtipos de cáncer.<sup>[6] [7]</sup>

La lámina propia se caracteriza por carecer de vasos linfáticos, los cuales están presentes en todas las capas de la pared del colon, salvo en la lámina propia. Está constituida por tejido conectivo laxo, y en ella se encuentran las células del sistema inmune como linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Estas células son conocidas con el nombre de MALT (tejido linfoide asociado a mucosas), que en esta zona pueden agruparse formando las denominadas Placas de Peyer. Debido a su localización, justo debajo del epitelio, en el caso de que la proliferación tumoral siga avanzando hacia las estructuras adyacentes, esta capa es la primera que se va a

afectar. Además, es la primera capa en la que ya encontramos un microentorno más diferente, porque ya presenta matriz extracelular, vasos, células del sistema inmune... Aunque no presenta vasos linfáticos, por lo que un tumor en esta fase de crecimiento aún no podría metastatizar por vía linfática.<sup>[6][7]</sup>

La **muscular de la mucosa** (o muscularis mucosae) es una delgada capa de fibras musculares lisas que presentan distinta orientación.<sup>[6][7]</sup>

La **capa submucosa** está formada por tejido conectivo muy denso altamente vascularizado y fibroblastos, aunque presenta algunas zonas con tejido adiposo. En ella se encuentra el plexo nervioso de Meissner, y diversos plexos vasculares constituidos por arteriolas, vénulas y vasos linfáticos. Una vez que el tumor alcanza esta capa, debido a que tanto en ella como en los siguientes estratos de la pared del colon ya hay vasos linfáticos, es más fácil que se produzca la diseminación tumoral, y por tanto, es más probable la producción de metástasis.<sup>[6][7]</sup>

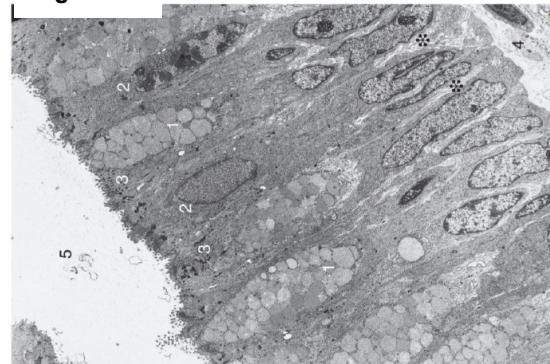
La **capa muscular** (o muscular propia) se organiza de forma distinta. Las fibras musculares lisas se disponen formando una capa circular interna, y una capa longitudinal externa que es más delgada que la circular aunque se engruesa para formar las tres tenias del colon, las cuales son visibles a simple vista. Entre ambas capas se encuentra el plexo nervioso de Auerbach. Además, ambas capas musculares están atravesadas tanto por vasos sanguíneos como por vasos linfáticos que se dirigen hacia la serosa.<sup>[6][7]</sup>

La **capa serosa** es una capa muy delgada de tejido conectivo, que en algunos puntos se continúa con el peritoneo, y que no está presente en su segmento distal ni en el recto.<sup>[6][7]</sup>

Figura 5.



Figura 6.



**Figura 5. Corte longitudinal de mucosa de colon, MO, H-E, x200.** (1) Criptas de Lieberkühn con abundantes células caliciformes. (2) Muscular de la mucosa.<sup>[9]</sup> **Figura 6. Corte oblicuo del epitelio de una cripta de Lieberkühn, ME, x3865.** (1) Células caliciformes. (2) Células absorbivas. (3) Gránulos de secreción apicales de las células absorbativas. (4) Lámina propia. (5) Luz intestinal.<sup>[9]</sup>

## 6. Cáncer de colon.

El cáncer es un trastorno genético causado por alteraciones genéticas y epigenéticas que modifican la expresión o la función de genes clave en los procesos celulares fundamentales, como el crecimiento, la supervivencia y la senescencia. Estas alteraciones genéticas son hereditarias, de modo que se transmiten a las células hijas en cada división celular. Se produce entonces una selección “darwiniana”, de manera que las células portadoras de mutaciones presentan ventajas de crecimiento o supervivencia respecto a las células normales adyacentes y, por tanto, acaban predominando en la población celular.<sup>[10]</sup>

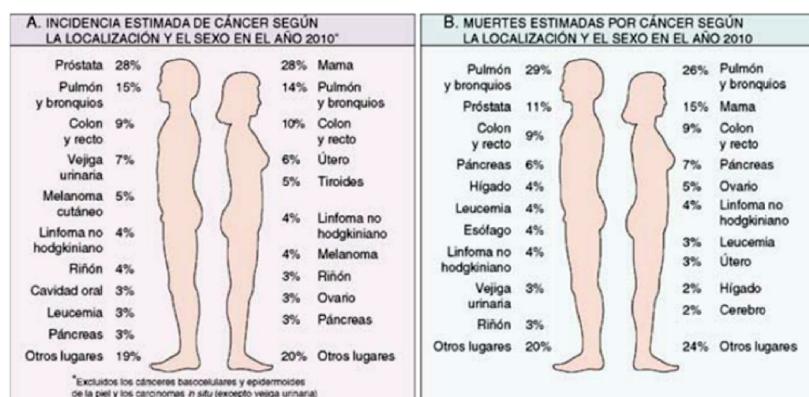
La acumulación de mutaciones da lugar a una serie de características distintivas de las células tumorales: 1) Autosuficiencia en las señales de crecimiento, por lo que el crecimiento tumoral se vuelve autónomo y deja de estar regulado por señales fisiológicas; 2) Ausencia de respuesta a señales inhibidoras del crecimiento; 3) Evasión de la muerte celular, permitiendo que las células cancerosas sobrevivan en condiciones que inducen apoptosis en las células normales; 4) Potencial de replicación ilimitado, es decir, las células cancerosas se convierten en inmortales; 5) Angiogénesis para mantener el crecimiento de las células cancerosas; 6) Capacidad de invasión local y de diseminación a distancia; 7) Reprogramación de vías metabólicas, hacia la glucólisis anaerobia, aunque haya oxígeno en abundancia, y 8) Capacidad de escapar al sistema inmunitario. Las alteraciones genéticas que dan lugar a esas características distintivas de los cánceres son constantes, y se mantienen y activan por el desarrollo de la inestabilidad genómica, lo que hace que la situación sea más compleja.<sup>[10]</sup>

Recientemente se ha comprobado que la inflamación, considerada hasta ahora una respuesta protectora frente a los tumores, también puede, paradójicamente, activar un proceso maligno en dos situaciones concretas: Inflamación crónica persistente en respuesta a infecciones microbianas o a una reacción autoinmunitaria, y cuando la inflamación se produce como respuesta a un tumor. La reacción inflamatoria constituye una proliferación celular compensadora en un intento por reparar el daño existente (infección, reacción autoinmune, tumor...), pero en cambio tiene un efecto protumoral debido a la gran secreción de factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y otras sustancias bioactivas por parte de las células inmunitarias activadas que se acumulan en esa zona; y al daño del ADN celular causado por la mayor probabilidad de desarrollo de mutaciones genéticas que produce la replicación celular persistente y la disminución de la apoptosis, y el hecho de que algunas células inflamatorias, como los neutrófilos, pueden secretar especies reactivas de oxígeno.<sup>[10]</sup>

## **6.1. Epidemiología.**

El cáncer colorrectal es uno de los tumores malignos más prevalentes en los países occidentales, ocupando el tercer lugar en frecuencia y el cuarto en mortalidad.<sup>[11]</sup> <sup>[12]</sup>

En España, representa la segunda causa más frecuente de cáncer, y de muerte por cáncer, tanto en hombres como mujeres, sólo por detrás del cáncer de pulmón y de mama, respectivamente; con unos 26.000 casos nuevos al año. La incidencia varía en función de la edad, incrementándose significativamente a partir de los 50 años. Asimismo, otros factores como el hecho de ser hombre o de raza negra, también aumentan el riesgo de padecerlo; además de los numerosos factores dietéticos, del estilo de vida y hereditarios que se ha visto que están implicados en su desarrollo.<sup>[10]</sup> <sup>[11]</sup> <sup>[12]</sup> <sup>[13]</sup>



**Figura 7. Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer según la localización y el sexo, en Estados Unidos en el año 2010.** Ocupaba el tercer lugar tanto en frecuencia como en mortalidad.<sup>[10]</sup>

## **6.2. Características.**

La edad de presentación habitual del cáncer de colon esporádico es entre los 60-70 años, a diferencia de las formas hereditarias en las que suele aparecer antes de los 50 años.<sup>[10]</sup> <sup>[13]</sup>

Es un tumor de crecimiento lento, cuya forma de presentación depende en gran medida de su localización. Así, los tumores del colon izquierdo generalmente se manifiestan mediante rectorragia y/o cambios en el ritmo deposicional (estreñimiento o falsa diarrea) debido a la disminución de la luz del colon; mientras que los tumores del colon derecho suelen presentarse en forma de astenia, debilidad y anemia ferropénica por hemorragia oculta, y rara vez producen obstrucción.<sup>[12]</sup> <sup>[13]</sup> Metastatizan

frecuentemente en hígado, a excepción del cáncer de recto, pero también en los ganglios linfáticos regionales, pulmón y hueso.<sup>[10]</sup>

Se debe sospechar un cáncer de colon ante todo paciente que presenta un cambio reciente del ritmo deposicional (sobre todo en edades avanzadas, sin causa aparente), rectorragia, hematoquecia, o anemia crónica. Para confirmarlo, se realiza una colonoscopia, en la que además de observar la tumoración (y otras posibles lesiones sincrónicas), se toman biopsias que darán el diagnóstico histológico definitivo. Una vez establecido el diagnóstico, debe efectuarse el estadiaje del tumor, el cual se lleva a cabo en la mayoría de las ocasiones mediante una radiografía de tórax con el fin de descartar metástasis pulmonares, y una tomografía computarizada abdominal para investigar la existencia de afectación hepática, mesentérica, ganglionar y/o pélvica. La determinación del antígeno carcinoembrionario (CEA) es útil para el seguimiento de los pacientes tras la resección quirúrgica.<sup>[11] [12] [13]</sup>

El tratamiento de elección es la cirugía, que será diferente en función de la localización del tumor y de la presencia o no de complicaciones asociadas. Tras una resección radical, si no hay evidencia de diseminación a otros órganos, se efectúa un tratamiento complementario mediante quimioterapia y/o radioterapia adyuvante, con el objetivo de reducir la tasa de recidiva. En el cáncer colorrectal metastásico en cambio, se utiliza un tratamiento multidisciplinar basado en la quimioterapia.<sup>[13]</sup>

### **6.3. Pronóstico.**

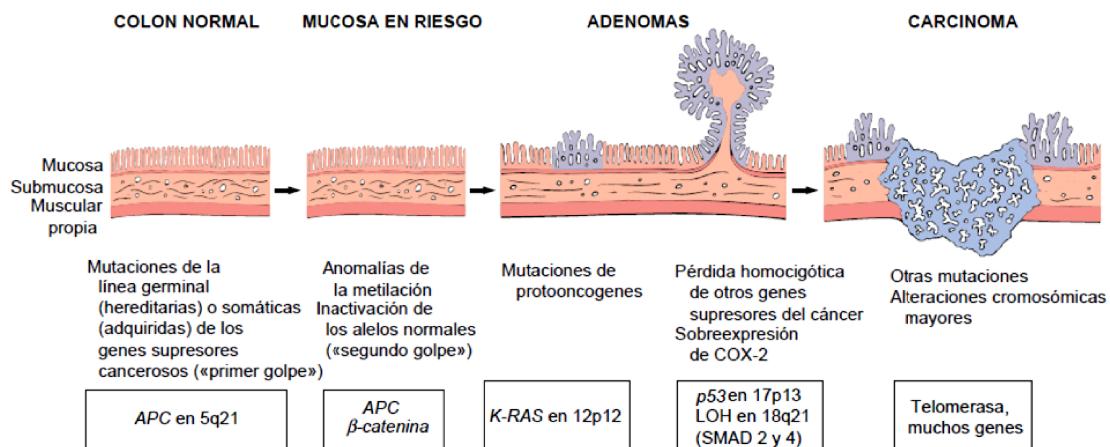
La supervivencia media del cáncer colorrectal en España a los cinco años es del 61,5%, situándose por encima de la media europea, que es del 56,2% y más baja que la de Estados Unidos, que se estima en un 65,5%.<sup>[13]</sup>

La supervivencia depende fundamentalmente del estadio tumoral en el momento del diagnóstico, es decir, de la profundidad de la infiltración y de la presencia o no de metástasis. Por lo que según la clasificación TNM, la supervivencia a los cinco años es del 95-100% en el estadio I, del 70-85% en el estadio II, del 50-70% en el estadio III, y del 5-15% en el estadio IV. Aunque se han descrito otros factores que se asocian a un peor pronóstico, como la edad (que aparezca antes de los 40 años o después de los 70 años), la presencia de complicaciones relacionadas con el tumor (perforación, obstrucción) o de comorbilidades, el grado de diferenciación tumoral, la presencia de invasión vascular, linfática o perineural, etc.<sup>[10] [12] [13]</sup>

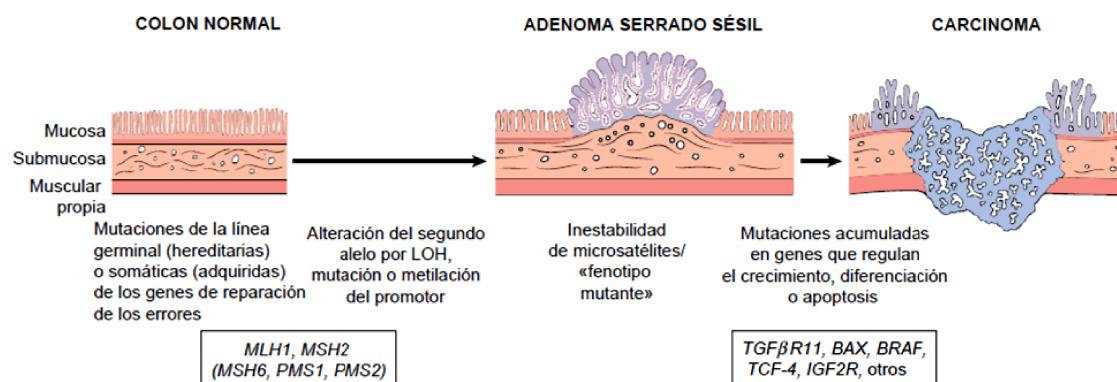
## **6.4. Patogenia.**

La historia natural del cáncer colorrectal, independientemente de su origen hereditario o esporádico, es similar. Se origina a partir de una lesión premaligna, un adenoma, que suele tardar unos diez años en malignizar.<sup>[11] [12] [13]</sup> Los mecanismos de alteración genética que promueven el desarrollo de esa lesión premaligna y su posterior progresión hacia un adenocarcinoma de colon se agrupan en tres vías:

- (1) La vía supresora (o inestabilidad cromosómica), responsable de la típica secuencia adenoma – carcinoma (Fig.8). Es la más frecuente. Se debe al acumulo de anomalías cromosómicas que promueven la carcinogénesis mediante la inactivación de genes supresores de tumores como APC, K-RAS, SMAD4... y el aumento de la expresión de oncogenes. Inicialmente, esto provoca una proliferación epitelial localizada, la cual dará lugar a pequeños adenomas que irán creciendo con el tiempo, volviéndose más displásicos y finalmente evolucionarán a adenocarcinomas invasores.<sup>[10] [12] [13]</sup>
- (2) La vía mutadora (o inestabilidad de microsatélites) (Fig.9), que se caracteriza por el acumulo de mutaciones en el genoma por un defecto en la reparación del ADN, dándose con mayor frecuencia en secuencias repetitivas cortas de ADN (microsatélites). Se producen mutaciones en genes como MLH1, MSH2... Y aunque no hay una secuencia adenoma – carcinoma fácilmente identificable, sí que parece que proceden de adenomas serrados sésiles que con el tiempo irán creciendo y evolucionando hacia adenocarcinomas, y que estos tumores muestran unas características morfológicas distintivas: localización proximal, características histológicas de predominancia mucinosa, infiltración por linfocitos y un mejor pronóstico.<sup>[10] [12] [13]</sup>
- (3) Y por último, la expresión del fenotipo CIMP (CpG Island Methylator Phenotype), que provoca la inactivación transcripcional por metilación de las citosinas localizadas en las islas CpG de determinados genes supresores tumorales. Las islas CpG son regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazadas por fosfatos.<sup>[10] [12] [13]</sup>



**Figura 8. Cambios morfológicos y moleculares en la secuencia adenoma-cáncer (vía supresora o de inestabilidad cromosómica).** Se producen mutaciones en APC, KRAS, SMAD2, SMAD4 y p53. Aunque parece haber una secuencia temporal de cambios, lo más importante es la acumulación de las mutaciones, y no su aparición en un orden específico.<sup>[10]</sup>



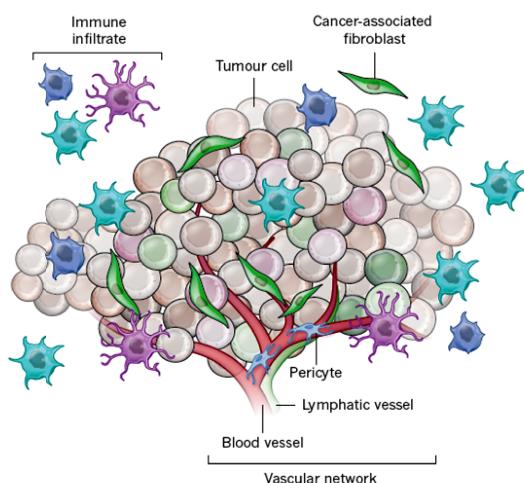
**Figura 9. Cambios morfológicos y moleculares en la vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites.** Los defectos de los genes de reparación de los errores de apareamiento dan lugar a la inestabilidad de los microsatélites y permiten la acumulación de mutaciones en muchos genes, si éstos están implicados en la supervivencia y proliferación celular, se puede desarrollar el cáncer.<sup>[10]</sup>

## 6.5. Descripción del microentorno tumoral del cáncer de colon. Anatomía patológica.

El conocimiento acerca de la patogénesis tumoral ha avanzado enormemente en las últimas décadas. Mediante la identificación de oncogenes y genes supresores de tumores se aceptó que el cáncer es una enfermedad debida a alteraciones genéticas. Sin embargo, numerosos estudios posteriores han demostrado que la proliferación tumoral no se produce únicamente por la presencia de alteraciones genéticas en las células tumorales, sino también por las ventajas que tales mutaciones

le proporcionan. La progresión tumoral y posterior invasión metastásica requieren de la conjunta evolución de las células tumorales con el microentorno. Este microentorno está formado por múltiples elementos como células no transformadas, matriz extracelular, vascularización tumoral y células del sistema inmune, de manera que todos ellos participan activamente en el proceso de tumorogénesis. De modo que existe un continuo diálogo adaptativo entre las células tumorales y su microentorno tumoral, mediado por el contacto directo de las células con los componentes del estroma o a través de factores de señalización secretados (citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento).<sup>[14] [15] [16]</sup>

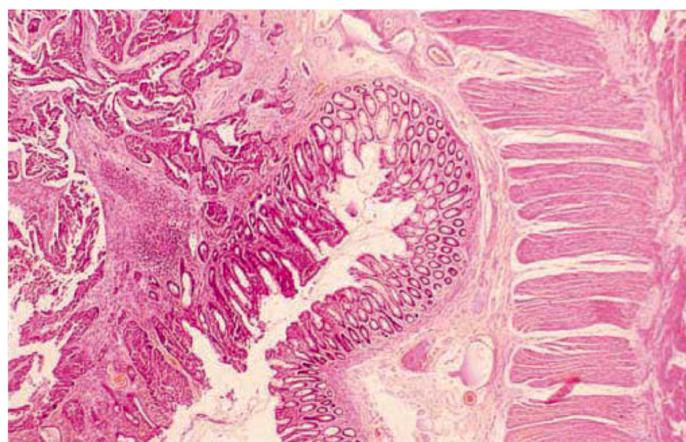
En muchos tumores, se ha observado que el estroma tumoral es diferente del estroma del tejido normal correspondiente. En el tejido sano, el estroma funciona como la principal barrera contra la tumorogénesis, y está constituido por diversos tejidos conectivos que actúan como una estructura de apoyo o andamio para el crecimiento de otros tejidos y órganos.<sup>[14] [17]</sup> Asimismo, en él se disponen el resto de células o factores que forman parte de este microentorno. Contiene la matriz extracelular, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales, pericitos y células inflamatorias; así como numerosos factores de crecimiento, factores angiogénicos, citoquinas y proteínas de remodelación de la matriz.<sup>[15] [18]</sup> Por otro lado, el estudio de varios pacientes con cáncer de colon ha permitido identificar los componentes de su microentorno tumoral, el cual contiene un "estroma reactivo" caracterizado por presentar una matriz extracelular modificada, una mayor densidad de microvasos, células inflamatorias y fibroblastos con un fenotipo "activado", los denominados fibroblastos asociados al cáncer o CAFs.<sup>[16]</sup>



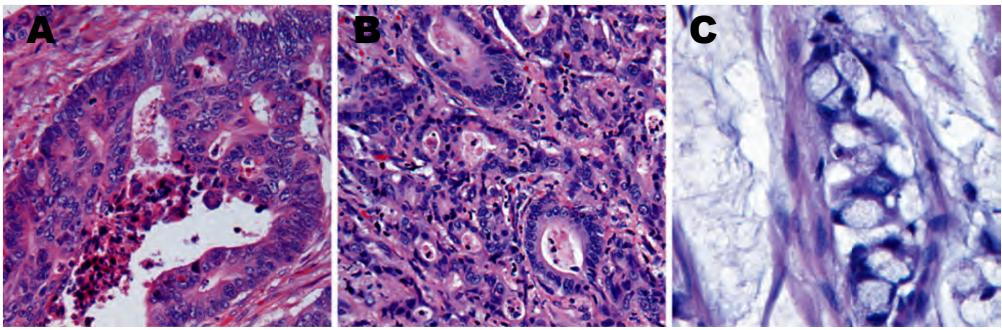
**Figura 10. Representación del microentorno tumoral.** Se observan las células tumorales rodeadas por diferentes elementos que constituyen el microentorno tumoral: fibroblastos asociados al cáncer, células inmunitarias, pericitos y vasos sanguíneos y linfáticos.<sup>[14]</sup>

Todos los carcinomas colorrectales empiezan como lesiones *in situ*, pero después evolucionan siguiendo diferentes patrones morfológicos según su localización. Los tumores del colon proximal tienden a crecer formando masas polipoideas, exofíticas, que se extienden a lo largo de la pared de ciego y colon ascendente, siendo infrecuente la obstrucción. En cambio, los tumores del colon distal tienden a formar lesiones anulares, que producen estenosis “en servilletero”. Aunque con el paso de los años, ambos tipos penetran la pared intestinal, llegando a aparecer incluso como masas firmes en la superficie serosa.<sup>[10]</sup>

Independientemente de su apariencia macroscópica, microscópicamente todos los carcinomas de colon son similares. La gran mayoría son adenocarcinomas, que constituyen más del 95% de los casos. De hecho, el adenocarcinoma de colon es el tumor maligno digestivo más frecuente, y se localiza predominantemente en sigma y recto. La mayor parte están constituidos por células cilíndricas altas, que recuerdan al epitelio displásico presente en los adenomas, y su consistencia firme es resultado de la intensa respuesta desmoplásica del estroma inducida por el componente infiltrante. Además, presentan estructuras glandulares más o menos diferenciadas, que producen diferentes cantidades de mucina, la cual diseca la pared intestinal facilitando su extensión y empeorando su pronóstico. Los tumores indiferenciados, que constituyen alrededor del 20% de los adenocarcinomas de colon, presentan una menor diferenciación glandular y tienen peor pronóstico que los bien diferenciados. En ocasiones, los tumores pueden estar constituidos por células en anillo de sello, parecidas a las presentes en el cáncer gástrico, o incluso presentar características neuroendocrinas.<sup>[10] [12] [13] [19]</sup> El carcinoma de células escamosas, en cambio, es el tumor más frecuente de la unión anorrectal (80%), y se caracteriza por su extensión local y ganglionar.<sup>[10] [13]</sup>



**Figura 11. Aspecto histológico del adenocarcinoma de colon. MO, H-E, x10.** Se observa un patrón glandular formado por células epiteliales neoplásicas pleomorfas.<sup>[20]</sup>

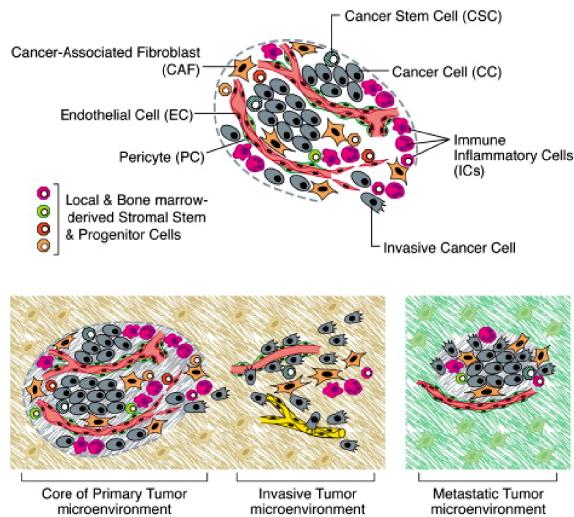


**Figura 12. Aspecto histológico de los diferentes tipos de adenocarcinoma colorrectal. MO, HE.**

**A)** x20. Adenocarcinoma bien diferenciado, con núcleos hipercromáticos elongados y restos necróticos en la luz glandular. **B)** x20. Adenocarcinoma indiferenciado, con nidos infiltrantes de células tumorales y alguna glándula. **C)** x40. Adenocarcinoma mucinoso con células en anillo de sello y cúmulos extracelulares de mucina.<sup>[10]</sup>

## 7. Influencia de los fibroblastos asociados al cáncer en la respuesta al tratamiento del cáncer de colon.

Como se ha comentado anteriormente, la progresión tumoral ya no se atribuye únicamente a alteraciones genéticas, sino que es fundamental la interacción de las células neoplásicas con su microentorno, transformándolo en uno que apoye y favorezca esta progresión, bien por contacto directo con el estroma, a través de factores de señalización como citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, o mediante la transformación de la matriz extracelular.<sup>[14] [16] [17]</sup> En muchos tumores sólidos se ha descrito un patrón morfológico similar al que se puede encontrar en la cicatrización de heridas, denominado “desmoplasia” y caracterizado por presentar una extensa proliferación de fibroblastos y tejido conectivo, así como un aumento del depósito de fibrina. Estas observaciones remarcán las similitudes existentes entre la reacción tisular que se produce en la cicatrización de heridas y en el cáncer, en relación con las células inflamatorias, los vasos sanguíneos, el tejido conectivo y los fibroblastos “activados”.<sup>[16] [17] [21] [22]</sup>



**Figura 13. Representación de los elementos del microentorno tumoral, y de la manera en la que influyen en la tumorogénesis. Favorecen el crecimiento tumoral primario, la invasión y la metástasis).<sup>[23]</sup>**

Como ya se ha descrito, el microentorno tumoral está compuesto por diferentes elementos: matriz extracelular, vascularización, células no transformadas, células del sistema inmunitario y un tipo especial de fibroblastos, los denominados “fibroblastos asociados al cáncer” o “CAFs”, los cuales vamos a ver con más detalle a continuación.<sup>[14] [16] [17]</sup>

## 7.1. Características diferenciales de los CAFs.

Los fibroblastos son el tipo celular más abundante en el tejido conectivo, y son los responsables de mantener la estructura tisular. En condiciones normales, se encuentran en un estado inactivo de reposo, activándose en situaciones que requieren la remodelación del tejido, como la cicatrización de heridas y la fibrosis.<sup>[14] [24] [25]</sup>

Los fibroblastos son esenciales para sintetizar y depositar la matriz extracelular mediante la producción de colágeno y fibronectina. También participan en la formación de la membrana basal que separa el epitelio del estroma, a través de la secreción de laminina y colágeno tipo IV. Son una amplia fuente productora de varios factores de crecimiento autocrino y paracrino que regulan el crecimiento tanto de las células circundantes como de sí mismos. Pero no sólo mantienen la integridad de la matriz extracelular y de la membrana basal, sino que en algunos casos, también contribuyen a su remodelación mediante la secreción de proteasas como la metaloproteinasa de matriz (MMPs) que degradan eficazmente la matriz. También participan en la cicatrización de heridas, “invadiendo” las lesiones y generando matriz extracelular, la cual actúa como un andamio para la regeneración de los tejidos. Para ello, los

fibroblastos necesitan activarse y convertirse en un tipo especializado de fibroblastos, el miofibroblasto, que está dotado de una mayor capacidad de síntesis de matriz extracelular. Sin embargo, el mecanismo de cómo estos miofibroblastos recuperan su fenotipo original aún no está claro. Además de los fibroblastos, otros tipos de células como las inflamatorias y el endotelio contribuyen a la integridad y la homeostasis del estroma.<sup>[17] [24] [25] [26]</sup>



**Figura 14. Micrografías comparativas de fibroblastos en diferentes estados de activación.** **A) Micrografía de fibroblasto inactivado, ME x5000.** En la que se observa el cuerpo celular y el núcleo de un fibroblasto (F), con sus numerosas prolongaciones citoplasmáticas finas (Fc), y fibras de colágeno (C) y de elastina (E).<sup>[6]</sup> **B) Micrografía de un fibroblasto activo o maduro, ME x18500.** En la que se observa su núcleo (N) moderadamente condensado y sin nucléolo, y fibras de colágeno.<sup>[6]</sup> **C) Micrografía de un miofibroblasto, ME x12500.** Se observan microfilamentos submembranosos con pocos cuerpos densos (↑) y microfilamentos intracitoplasmáticos con cuerpos densos (↑) correspondientes a fibras de tensión en formación.<sup>[27]</sup>

Los Dres. Micke y Östman sostienen que en condiciones normales, los fibroblastos podrían estar implicados en supresión de la formación de tumores, ya que podrían ser capaces de revertir las células tumorales a un fenotipo normal<sup>[16]</sup>; pero los CAFs son una subpoblación de fibroblastos estromales que pueden promover significativamente la tumorogénesis y el posterior desarrollo de metástasis, respaldando el crecimiento celular tumoral, impulsando la angiogénesis y contribuyendo a la remodelación de la matriz extracelular. Esto se debe a que en comparación con los fibroblastos del tejido normal, los CAFs tienen aumentada su proliferación, su producción de matriz extracelular y una secreción única de citoquinas, como pueden ser el factor 1 derivado de células estromales o SDF1, el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF, o el factor de crecimiento de hepatocitos o HGF. Además, a diferencia de los fibroblastos normales y los miofibroblastos, los CAFs se activan permanentemente, sin poder volver a un fenotipo normal ni sufrir apoptosis.<sup>[14] [16] [17] [24] [28]</sup>

Morfológicamente, los CAFs se caracterizan por ser células de gran tamaño en forma de huso, y presentar núcleos dentados, filamentos contráctiles (fibras de estrés) y un fibronexus bien desarrollado, que es un complejo transmembrana con actina intracelular, integrinas y fibronectina extracelular. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha observado que expresan diferentes marcadores, aunque no de manera patognomónica: actina  $\alpha$  de músculo liso ( $\alpha$ -SMA, un marcador de músculo liso), vimentina (un marcador mesenquimal), proteína de activación de fibroblastos (FAP), Thy-1, desmina, proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1, también llamada S100A4) y el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR  $\alpha$  /  $\beta$ ). Además, se ha visto que en la mayoría de los casos, los CAFs son negativos para los marcadores epiteliales o endoteliales como citoqueratina y CD31, y que el nivel de expresión de la laminina, cuya función es mantener la integridad de la membrana basal, está significativamente reducida en ellos.<sup>[14] [16] [17] [24] [25] [29]</sup>

Se ha advertido que en el cáncer de colon, los CAFs se sitúan preferentemente en el borde tumor - estroma.<sup>[16]</sup>

Se ha observado que los CAFs que se encuentran en los diferentes tipos o subtipos de cáncer o incluso dentro del mismo cáncer, expresan distintos genes y proteínas, lo que les proporciona diversas propiedades que darán lugar a diferentes comportamientos y respuestas. Esto puede deberse a dos motivos. Por un lado, puede deberse a que tengan un origen heterogéneo, y dependiendo de la célula de la que procedan, se van a comportar de una u otra manera. Y por otro lado, la diferencia puede radicar en los factores de crecimiento y moléculas de señalización paracrina secretados por las células tumorales para moldear el microentorno tumoral, y por consiguiente a los CAFs.<sup>[14] [17] [22] [25]</sup>

## 7.2. Diferentes hipótesis sobre el posible origen de los CAFs.

A lo largo de los años, se han propuesto diversas teorías sobre el posible origen de los fibroblastos asociados al cáncer presentes en el estroma tumoral:

**(1) Los fibroblastos ya existentes previamente en el estroma del tejido normal sufren una conversión.** Varios estudios han mostrado que no sólo los fibroblastos normales se transforman en CAFs por acción de moléculas extracelulares como factores de crecimiento y citoquinas, sino que también pueden sufrir alteraciones genéticas. Entre otras se pueden presentar mutaciones puntuales, pérdida de heterocigosisidad y cambios en el número de copias genéticas en oncogenes y genes

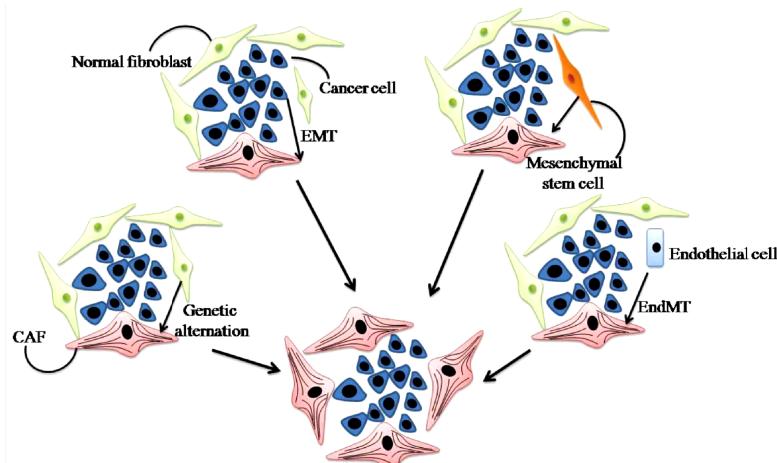
supresores tumorales. Todas las alteraciones descritas anteriormente parecen ser inducidas por las células tumorales adyacentes. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de las muestras tumorales y a los diferentes métodos de análisis, el hecho de que los CAFs se produzcan como resultado de alteraciones genéticas sigue siendo controvertido. [16] [17] [24]

**(2) Las células del entorno vascular pueden convertirse en CAFs a través de una transdiferenciación.** Hecho que apoya la similitud de los CAFs con las células musculares lisas vasculares y los pericitos, tanto a nivel morfológico como en la expresión de marcadores. Por ejemplo, esta transdiferenciación se asocia con la aparición de un marcador mesenquimal, la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1) y la regulación a la baja de CD31 / PECAM. También se ha llegado a describir que el TGF-β es capaz de inducir la conversión fenotípica de células endoteliales a fibroblastos provocando una transición endotelio-mesénquima. [16] [17] [22] [24]

**(3) Hallazgos más recientes también sugieren la posibilidad de que puedan derivar de las propias células tumorales epiteliales a través de la transición epitelio-mesenquimal.** Este es un proceso en el que las células epiteliales con uniones estrechas se convierten en células mesenquimales con menor adhesión celular, y por tanto, adquieren una mayor motilidad. Aunque las células cancerosas no logran generar la mayoría de los CAFs a través de esta transición epitelio-mesenquimal, las células epiteliales normales circundantes pueden ser una fuente adicional de CAF al someterse a ella como respuesta a estímulos del microentorno. En la mayoría de los casos, los CAF generados por este proceso pueden no ser tan malignos como las células tumorales, pero son capaces de promover significativamente el crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis. [16] [17] [22] [24]

**(4) Las células mesenquimales procedentes de la médula ósea son una potencial fuente de CAFs:** Se ha demostrado que las células mesenquimales circulantes derivadas de la médula ósea son capaces de proliferar en el estroma tumoral. Además, existe evidencia de que la médula ósea contribuye a la producción de los miofibroblastos y fibroblastos de la respuesta desmoplástica, así como a la angiogénesis tumoral, linfangiogénesis, inhibición de la apoptosis y formación de un nicho de células madre de cáncer. Estudios en animales usando precursores de médula ósea transplantados han demostrado que pueden derivar de células precursoras de mieloides; y estudios recientes sugieren que las células madre mesenquimales proliferan selectivamente en las áreas tumorales y contribuyen a su formación. [16] [17] [18] [24]

**(5) Un estudio del Dr. Micke y sus colaboradores defiende un origen heterogéneo**, es decir, que pueden darse varias de las opciones anteriormente descritas simultáneamente. Se demostró que los fibroblastos asociados al cáncer son reclutados a partir de fibroblastos residenciales, en menor medida de las células del músculo liso vascular y muy raramente de los pericitos.<sup>[16]</sup>



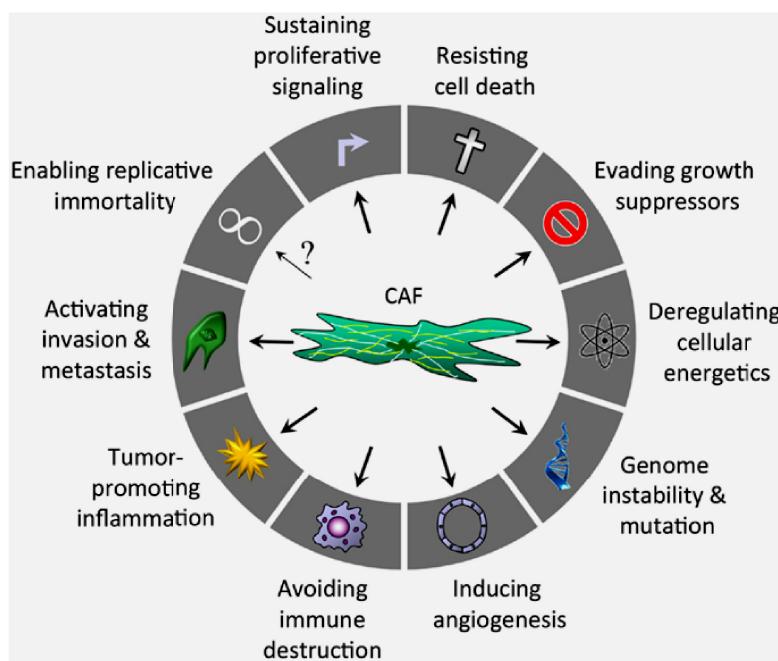
**Figura 15. Posibles orígenes de los CAFs.** Los fibroblastos normales, las células epiteliales tumorales, las células mesenquimales e incluso las células endoteliales podrían convertirse en CAFs bajo diferentes microentornos tumorales.<sup>[17]</sup>

### 7.3. Señales involucradas en el reclutamiento y diferenciación de los CAFs.

Se han descrito diferentes mecanismos moleculares que conducen a la activación del estroma y, más exactamente, a la conversión y / o reclutamiento de fibroblastos. Entre estos mecanismos, se incluyen lesiones microvasculares, contactos celulares directos y factores solubles, como hormonas, citoquinas, quimioquinas, proteínas de la matriz extracelular, proteinasas, inhibidores de proteasa y factores de crecimiento. De entre los factores de crecimiento implicados en el proceso se ha sugerido que el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores I y II de crecimiento insulínico (IGF I y II) y el factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF) son los que parecen tener un papel más relevante.<sup>[16] [30]</sup>

## 7.4. Papel de los fibroblastos asociados al cáncer en la progresión tumoral.

Se han descrito diferentes teorías sobre la manera en la que podrían actuar. Pero además de actuar de diferentes formas, lo hacen con diferentes fines, es decir, no sólo promueven el crecimiento del tumor, sino que también facilitan la invasión hacia estructuras vecinas, favoreciendo la metástasis tumoral.



**Figura 16. Características que presenta el cáncer regulado por CAFs.** Resistencia a la muerte celular, evasión de los supresores del crecimiento y del sistema inmune, mutaciones e inestabilidad genómica, inducción de angiogénesis e inflamación...<sup>[31]</sup>

### 7.4.1. Los CAFs apoyan el crecimiento del tumor primario.

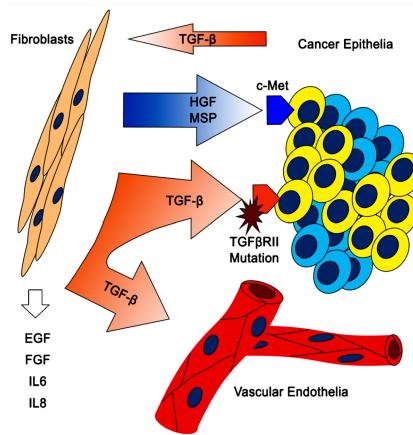
Recientemente se han descrito en la literatura varios mecanismos que inducen la proliferación tumoral. A continuación, vamos a mencionar algunos de los más relevantes.

Uno de los parámetros que mejor podrían promover el crecimiento de las células tumorales es la irradiación de los fibroblastos. Se ha descrito que los fibroblastos dañados o irradiados provocan aberraciones en el estroma que pueden preceder y estimular el desarrollo de tumores en comparación con los fibroblastos no irradiados.<sup>[14] [16]</sup>

Los CAFs secretan factores de crecimiento para potenciar el crecimiento de las células cancerosas. En el estudio de pacientes con cáncer de colon, se han hallado abundantes factores promotores del crecimiento en el medio acondicionado por los CAF en comparación con el acondicionado por los fibroblastos normales de la piel. Algunos de los diversos factores de crecimiento y citoquinas secretados, son:

- **Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )**. Se secreta en la matriz extracelular como un complejo latente, y posteriormente se activa por proteasas y otras proteínas de la matriz. Las respuestas a TGF- $\beta$  son diversas y con frecuencia dependen del contexto celular. Por lo tanto, sólo podemos describir los efectos de TGF- $\beta$  de una manera simplificada. Se sabe que regula el crecimiento tumoral a través de múltiples mecanismos celulares tales como apoptosis, proliferación, angiogénesis, migración e invasión. El TGF- $\beta$  puede estimular la migración, la proliferación y la contractilidad de las células mesenquimales, y aumenta la producción de los componentes típicos de la matriz extracelular, como colágeno, tenascina-C, fibronectina, trombospondina, osteopontina, osteonectina, elastina e inhibidores de la proteasa. Además, es el único factor de crecimiento que es capaz de transformar directamente fibroblastos a miofibroblastos. Sin embargo, muestra propiedades antiproliferativas después de que los fibroblastos se transformen en miofibroblastos. De todo esto, se deduce que el papel del TGF- $\beta$  en el desarrollo tumoral es complejo y a menudo ambiguo. El estudio del grupo del Dr. Hawinkels y sus colaboradores demostró que la interacción de las células tumorales con los fibroblastos residentes provocan una señalización hiperactiva de TGF- $\beta$ 1. La transdiferenciación de los fibroblastos en CAFs  $\alpha$ -SMA-positivos provoca el acumulo de TGF- $\beta$  y proteinasas en el microentorno tumoral, creando así un círculo vicioso.<sup>[32]</sup> Según el conocimiento actual, el TGF- $\beta$  actúa como supresor tumoral en las etapas premalignas de la tumorigénesis, pero como pro-oncogénico en etapas posteriores del cáncer, conduciendo a la producción de metástasis.<sup>[16] [17] [24] [25] [32]</sup> Esto se ha visto por ejemplo en el cáncer colorrectal, en el que el estudio del grupo del Dr. Calon y sus colaboradores demostró que una alta expresión de TGF- $\beta$  en el microambiente tumoral se asocia con un alto riesgo de recaída tras el tratamiento, ya que favorece la colonización de órganos por las células tumorales, al estimular la secreción de IL11 por parte de los CAFs, lo cual desencadena la señalización GP130 / STAT3 en las células tumorales. Esto permite a las células metastásicas evitar la apoptosis, mientras que los ratones tratados con un inhibidor farmacológico del receptor tipo 1 de

TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R1) fueron resistentes a la formación de metástasis.<sup>[33]</sup> Además, un aspecto a debate es si la pérdida del receptor TGF- $\beta$  de tipo II (TBRII) en los CAFs, aumenta la proliferación celular tanto de los fibroblastos como de las células tumorales vecinas. Al insensibilizar el TBRII, se desencadena un círculo de retroalimentación en el que las células del estroma producen TGF- $\beta$  en exceso, por lo que se segregan grandes cantidades de HGF, SDF-1... que provocan a su vez una mayor producción de TGF- $\beta$  y el mantenimiento del fenotipo activado de los CAFs.<sup>[25] [26]</sup>



**Figura 17. Retroalimentación de TGF- $\beta$  debido a la insensibilidad del receptor en el epitelio tumoral.** Los CAFs secretan un gran número de factores de crecimiento y citoquinas, entre los que se encuentra TGF- $\beta$ , cuyos altos niveles promueven un microambiente tumoral de apoyo, mientras que HGF actúa directamente sobre el epitelio tumoral para promover el crecimiento tumoral y la metástasis.<sup>[26]</sup>

- **Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF):** Es secretado principalmente por las células endoteliales con el fin de reclutar pericitos y estabilizar los vasos sanguíneos. Aunque en el cáncer es secretado tanto por las células tumorales como por otros componentes del microentorno tumoral.<sup>[16] [30]</sup>

En general, sus efectos promotores de tumores pueden dividirse en:

- **Efectos autocrinos:** Aunque se han descrito sólo en determinados tipos de cáncer, como glioblastomas y sarcomas.<sup>[16]</sup>
- **Efectos estromales:** La mayoría de los tumores sólidos secretan ligandos de PDGF, pero carecen de la expresión de los correspondientes receptores de PDGF, lo que sugiere que PDGF puede actuar como un factor de crecimiento paracrino. Los ligandos de PDGF son potentes mitógenos y quimioatractantes para las células mesenquimales y se creen implicados en casi todos los trastornos proliferativos de origen fibroblástico, por lo que su participación en la formación de estroma tumoral parece evidente. Y aunque PDGF no es capaz de convertir fibroblastos

directamente en miofibroblastos, sí que puede indirectamente, por ejemplo mediante la estimulación de la liberación de TGF-β a partir de macrófagos estromales u otras células del estroma, promover la diferenciación miofibroblástica. Además, la estimulación de TGF-β puede conducir a la expresión de receptores de PDGF en fibroblastos, por lo que puede suponerse que PDGF sirve principalmente para movilizar las células diana, en lugar de transformarlas. Otro hallazgo reciente es que PDGF controla el nivel de presión intersticial del fluido (o IFP, la presión dentro del tejido conectivo), la cual es mayor en los tumores sólidos), suponiendo un obstáculo para la liberación eficaz del fármaco, disminuyendo la eficacia de la quimioterapia y favoreciendo así el crecimiento tumoral. Además, el propio PDGF puede inducir la liberación de componentes de la matriz y de factores de crecimiento, como IGF-I, HGF, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y endotelina 3 (ET3) que posteriormente también pueden modular el crecimiento del tumor y / o el entorno del tumor.<sup>[16] [30] [34]</sup>

- **Efectos angiogénicos:** Además, el PDGF es importante para el reclutamiento y diferenciación de pericitos; estabiliza los vasos sanguíneos inmaduros y contribuye a su integridad funcional, por lo que también puede ser clave para la vascularización tumoral. El aumento de expresión de PDGF-C podría mediar la refracción a la terapia antiangiogénica *in vivo*.<sup>[14]</sup>  
<sup>[16] [24]</sup>

- **Factor transcripcional Snail-1:** La expresión de este factor transcripcional en los CAFs de pacientes con cáncer de colon se ha asociado a una supervivencia más corta, y por tanto, a un peor pronóstico, ya que aumenta la capacidad migratoria de las células neoplásicas. No se conoce con exactitud la manera en la que funciona, pero posiblemente su efecto promigratorio paracrino se deba a la inducción de cambios en el perfil de las citoquinas secretadas.<sup>[35]</sup>
- **Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).** Los CAFs observados en el frente de invasión en el cáncer de colon expresan gran cantidad de factores pro-invasivos como el factor de dispersión o el factor de crecimiento de hepatocitos (SF / HGF) y la glicoproteína tenascina-C (TNC). Además, se ha correlacionado significativamente la abundante expresión de HGF con la reducción de la capacidad de respuesta al tratamiento farmacológico. Por ejemplo, hace que las células tumorales sean resistentes a la inhibición de BRAF en líneas celulares

que albergan la mutación BRAF (V600E) a través del aumento de la fosforilación de su receptor afín, MET.<sup>[14] [17] [24]</sup>

- **Proteína secretada por fibroblastos 1 (FSP1)**, estudios han demostrado que es capaz de alterar el microambiente tumoral, haciéndolo favorable para la progresión del cáncer, mediante la producción de abundante VEGF-A, que favorece la angiogénesis, y tenascina-C, que proporciona a las células cancerosas protección contra la apoptosis.<sup>[17] [30]</sup>
- **Factor derivado del estroma 1 (SDF-1)**. Se ha visto que es capaz de reclutar precursores de células endoteliales (CPE), promoviendo así la angiogénesis. Además, SDF-1 $\alpha$  también conocido como CXCL12, es el ligando de CXCR4 que se expresa altamente en las células cancerosas, y el receptor tipo 4 de la chemoquina C-X-C (CXCR4) activado puede estimular directamente la proliferación de células cancerígenas.<sup>[17]</sup>

Pero los CAFs no sólo segregan factores de crecimiento, sino que también segregan **citoquinas o quimioquinas inflamatorias** como la interleucina-6 (IL6) y la interleucina-8 (IL8) / CXCL8. La IL6 se expresa abundantemente en el cáncer de colon, y se correlaciona directamente con el estadio del cáncer y la mortalidad. La IL8 participa en la iniciación tumoral, progresión, metástasis y angiogénesis.<sup>[24] [37]</sup>

Además de la secreción de una variedad de factores que promueven la carcinogénesis, los CAF también modifican el estroma tumoral **mecánicamente**. Generan pistas mediadas por la fuerza y las proteasas en la matriz extracelular, a través de las integrinas  $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 5, y las células cancerosas los siguen a lo largo de las vías. Además, los CAF transmiten señales mediante la **mecanotransducción**, un proceso por el cual los fibroblastos activados convierten la estimulación física en señales químicas que conducen a la activación de las vías de señalización del cáncer.<sup>[24]</sup>

Asimismo, los CAF pueden actuar como un **mutágeno** que aumenta la capacidad tumorigénica de las células cancerosas:

- Por ejemplo, las **especies de oxígeno reactivo** (ROS) que son generadas por CAFs bajo la influencia de un entorno con bajo pH e hipoxia, podrían actuar directamente como un mutágeno para las células adyacentes.<sup>[17]</sup>

- Por otro lado, la sobreexpresión de TGF-β por parte del estroma irradiado también favorece su capacidad tumorogénica. Como ya hemos comentado, TGF-β es el único factor de crecimiento conocido que es capaz de transdiferenciar fibroblastos en CAFs, y actúa como un potente quimioatraventante que es capaz de reclutar fibroblastos fuera de la región del tumor.<sup>[17] [24]</sup>
- Pero los CAF, incluso pueden afectar el crecimiento de las células cancerosas mediante la mediación de sus vías metabólicas. Por ejemplo, durante la proliferación tumoral, prefieren utilizar la glicólisis anaeróbica incluso en presencia de oxígeno, esto se conoce con el nombre de “Efecto de Warburg”, y son capaces de activar algunas vías metabólicas complementarias para amortiguar y reciclar productos de metabolismo anaeróbico con el fin de mantener el crecimiento tumoral.<sup>[17] [24] [36]</sup> En un estudio de los Dres. Chen y Huang se encontró que estos CAF eran deficientes en la proteína Cav1, cuya función se centra en la supresión tumoral y el transporte lipídico, por lo que la pérdida de Cav1 podría servir como biomarcador predictivo para la glicolisis aeróbica, indicando un mal pronóstico.<sup>[26]</sup> También se ha observado que el epitelio del cáncer de colon muestra características del metabolismo anaeróbico. Por ejemplo, expresa altos niveles de lactato deshidrogenasa-5 (LDH5) y de factor inducible por hipoxia 1α (HIF1α).<sup>[26]</sup>

#### **7.4.2. Los CAFs apoyan la invasión y metástasis tumoral.**

Los CAFs hallados en las regiones de cáncer no sólo son capaces de promover el crecimiento de las células cancerígenas, sino también de aumentar su invasividad a través de interacciones célula-célula y mediante varias moléculas pro-invasivas, incluyendo citoquinas, quimioquinas y diversos mediadores inflamatorios. A continuación, se va a explicar con mayor detalle alguno de éstos mecanismos.

(1) Mediante contactos heterotípicos transitorios de célula-célula o por factores difusibles paracrinos, estimulan el crecimiento tumoral hacia las estructuras adyacentes, favoreciendo la invasión tumoral.<sup>[17] [21] [24] [27]</sup>

(2) A través de la secreción de factores de crecimiento locales, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el TGF-β y otros factores de crecimiento del tejido conectivo.<sup>[17] [24] [29]</sup> O mediante la secreción de otras moléculas, como la IL-6. Se ha observado que los fibroblastos del estroma aislados del cáncer de colon producen

cantidades significativas de IL-6, la cual aumenta la producción de VEGF por parte de los fibroblastos, induciendo así la angiogénesis. Además, *in vivo*, el anticuerpo anti-receptor de IL6 dirigido al estroma muestra una mayor actividad antitumoral que dirigido frente a las células tumorales.<sup>[34] [37]</sup>

(3) Por medio de la secreción de diversas moléculas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal: Romper la membrana basal es el primer paso para que las células cancerosas infiltren el sistema circulatorio. Y por otro lado, las proteínas remodeladas de la matriz extracelular pueden alterar el nivel de expresión de algunos genes específicos que son esenciales para el andamio estructural y la organización del citoesqueleto.<sup>[17] [30]</sup> Los CAF son potencialmente invasivos, y los resultados de algunos experimentos *in vivo* han mostrado que pueden invadir las áreas tumorales. Se ha demostrado que pueden servir como estructura guía para dirigir la migración de las células tumorales, facilitando su paso mediante la degradación de la membrana basal y la modificación tanto proteolítica como estructural de la matriz extracelular, creando caminos que persisten después de la descelularización, lo que implica que las fibras de colágeno realineadas dentro de las paredes de éstos, han adquirido cierto grado de estabilidad a través de la reticulación del colágeno.<sup>[17] [29] [30]</sup> Los CAF inducen la reticulación del colágeno del estroma tumoral, ya que la rigidez del estroma estimula la invasión tumoral. Aunque no está claro cómo se regula la activación de este proceso.<sup>[29]</sup>

En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre las metaloproteinasas y sus inhibidores mantiene la matriz extracelular en una forma bien organizada. Pero en un microentorno tumoral, los CAFs secretan diversas proteasas degradadoras de la matriz, así como moléculas activadoras de estas, como por ejemplo el activador de plasminógeno del tipo urocinasa (uPA). La remodelación de la matriz extracelular por las metaloproteinasas (MMP1, MMP2, MMP3...) es uno de los pasos más cruciales para la progresión tumoral, contribuyendo a la angiogénesis y metástasis, así como para la formación de un microentorno favorecedor de éstas. Ya que la matriz remodelada proporciona un nicho seguro para la supervivencia y proliferación de las células cancerosas que conduce a la recurrencia del cáncer.<sup>[17] [24] [25] [30]</sup> Asimismo, se ha hallado que la abundancia de células estromales o la expresión elevada de metaloproteinasas de la matriz se correlacionan con una mayor agresividad y un mal pronóstico en ciertos cánceres.<sup>[14] [17]</sup> Se ha observado que los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) disminuyen la actividad de las MMPs, pero además, también pueden regular otros factores de crecimiento independientes de las MMP, lo que indica que pueden estar involucrados en algunas vías oncogénicas importantes.<sup>[17]</sup>

Otra molécula implicada es FAP, una glicoproteína que tiene actividad de colagenasa y dipeptidil peptidasa (DPP), por lo que ayuda a degradar la matriz extracelular.<sup>[17][24]</sup>

En relación con esto, se ha visto que la expresión de podoplanina, un marcador para las células endoteliales linfáticas, en los fibroblastos asociados al cáncer colorrectal es un marcador de pronóstico favorable, puesto que parece tener un papel protector contra la invasión de células cancerosas.<sup>[24]</sup> Asimismo, la alta expresión del receptor de vitamina D en los fibroblastos del estroma tumoral también se ha asociado con una mejor supervivencia global y supervivencia libre de progresión en el cáncer colorrectal, independientemente de su expresión en las células tumorales, debido a que 1,25 (OH) 2D3 impide la activación protumoral de los CAFs al inhibir la contracción del colágeno (un sello de la activación de fibroblastos) y la acción promigratoria en las células del carcinoma de colon. Por lo tanto, podría explorarse la posibilidad de tratar con agonistas de VDR a pacientes con cáncer colorrectal que expresen VDR en los fibroblastos de estroma tumoral incluso en ausencia de expresión de VDR en las células del carcinoma.<sup>[38]</sup>

(4) Los CAF inducen inflamación en las regiones tumorales. Se ha observado que la secreción de varios factores proinflamatorios por parte de los CAFs mantienen la región tumoral en un estado inflamatorio crónico que facilita el desarrollo de metástasis. Muchos datos clínicos y experimentales apoyan el hecho de que los fibroblastos juegan un papel crucial en las respuestas inmunes a través de la producción de citoquinas y quimioquinas. Además, no solo median la calidad sino también la cantidad de la respuesta inmune. En la fisiología normal, los fibroblastos pueden finalizar las respuestas inmunes mediante la retirada de las señales de supervivencia y normalizar los gradientes de quimioquinas que aceleran la apoptosis o retiran el tejido a través de los vasos linfáticos. Los macrófagos son atraídos activamente a regiones tumorales a lo largo de gradientes quimiotácticos definidos, y liberan una serie de factores que influyen en el comportamiento de las células endoteliales incluyendo VEGF, HGF, MMP2, IL-8. Despues, comienzan a diferenciarse en macrófagos asociados a tumores (TAMs) que mejoran aún más el crecimiento y la metástasis de las células cancerosas. Las células estromales crean un microambiente de inflamación crónica y tolerancia inmune, permitiendo que las células cancerosas sean expuestas a factores de crecimiento y evitando la vigilancia inmune mediante la secreción de diversas citoquinas, quimioquinas y otros factores, así como MMP que degrada la membrana basal, dando lugar a la formación de productos quimiotácticos para los leucocitos. Por otra parte, ciertas citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-

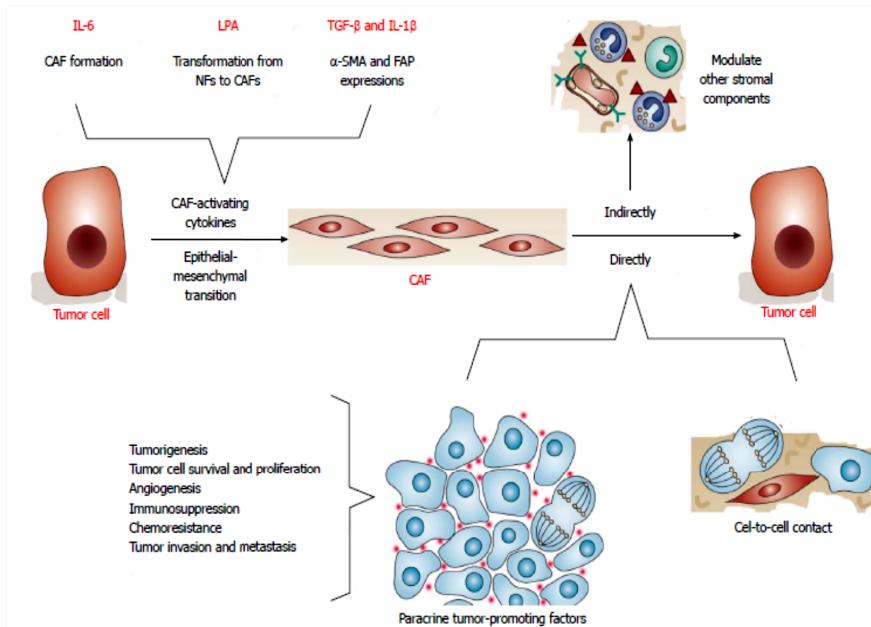
1b e IL-6 pueden elevar la expresión de IL-8, promoviendo la angiogénesis y la invasión de células tumorales.<sup>[15] [17] [34] [36]</sup>

#### **7.4.3. Otros mecanismos mediante los cuales los CAFs favorecen la progresión y la invasión tumoral.**

Sin embargo, la contribución de los CAF al desarrollo tumoral es aún mayor que la descrita hasta aquí. Los CAFs afectan a cada uno de los componentes del microambiente tumoral, produciendo efectos indirectos como la modulación de la acción de las células inmunitarias y las células endoteliales. Los CAFs actúan sobre escalas biológicas superiores tales como angiogénesis, hipoxia e inflamación.

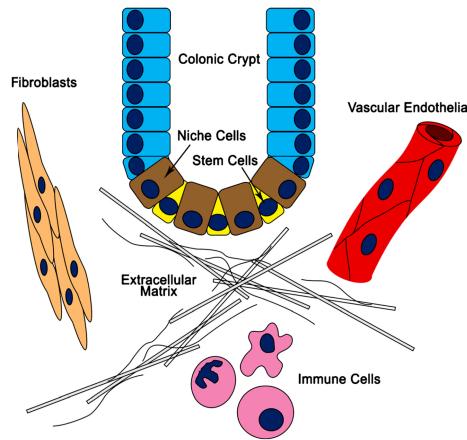
- La vascularización tumoral es dinámica y puede limitar el crecimiento tumoral.  
Una vascularización tumoral desorganizada da lugar a áreas de hipoxia y suministro limitado de nutrientes; la distancia de los lechos vasculares crea un gradiente que ha demostrado ser crucial para la distribución de fármacos a todas las células del tumor. En este caso la biodisponibilidad de los fármacos en la células tumorales es menor conforme mayor sea la distancia entre vasos. Otros aspectos, como la densidad de microvasos y la expresión elevada del ligando proangiogénico VEGFA están asociados con un peor pronóstico en el cáncer colorrectal. Además, la vascularización tumoral puede verse limitada por la naturaleza densa del estroma tumoral, que comprime los vasos tumorales, interrumpe el flujo sanguíneo eficiente y eleva la presión intersticial, todo lo cual puede obstruir el movimiento dentro y a través de los vasos tumorales. Un trabajo reciente sugiere que la citorreducción del estroma podría reducir la presión intersticial y mejorar la permeabilidad y el flujo del vaso, favoreciendo teóricamente la administración de fármacos.<sup>[14] [30]</sup>
- Aunque el sistema inmunológico tiene la capacidad de producir respuestas antitumorales, los mecanismos de supresión inmune pueden impedir este proceso. La heterogeneidad del contexto immune tumoral está influenciado por varios factores, entre los que se incluyen los secretados por los CAFs, la extensión y permeabilidad de la vascularización, y las propias células tumorales. El sistema inmunológico puede estar implicado tanto en la resistencia inherente, como adquirida a las terapias dirigidas. Incluso en los casos en los que inicialmente las células inmunitarias están impulsando activamente la respuesta a las terapias dirigidas, eventualmente puede surgir una serie de mecanismos

inmunosupresores que finalmente conduzcan a la progresión tumoral. Los subtipos de células inmunes han demostrado un valor pronóstico diferencial dependiendo de la indicación. Por ejemplo, en el cáncer colorrectal se ha observado una fuerte correlación entre la alta presencia de células T y un buen resultado clínico. TGF- $\beta$ 1 puede suprimir las funciones de varias células inmunitarias, particularmente de las células T efectoras y de las células asesinas naturales.<sup>[14] [30]</sup>

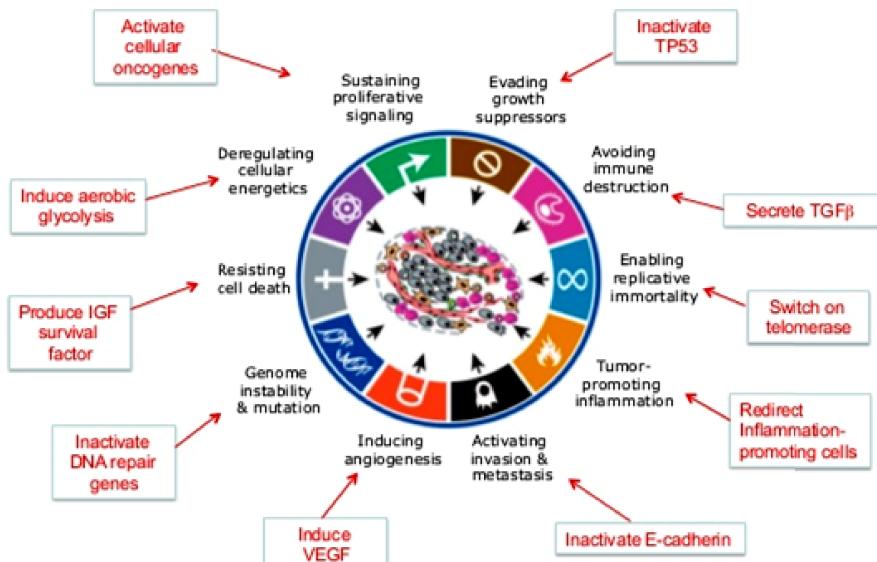


**Figura 18. La interacción entre los CAFs y las células tumorales.** Puede ser de manera directa, por contacto célula-célula o a través de factores paracriinos, o de manera indirecta, modulando el resto de componentes estromales.<sup>[39]</sup>

- Existencia de nichos que protejan a las células tumorales. La presencia de células que provocan la recurrencia tumoral a lo largo de los vasos adyacentes sugiere que un nicho físico protege las células madre tumorales en el espacio perivascular frente al tratamiento farmacológico. Del mismo modo, las regiones hipóxicas de los tumores pueden albergar y apoyar la supervivencia de las células madre de cáncer de colon durante la quimioterapia. El origen de estos nichos no está claro, pero se ha sugerido la posibilidad de que las células madres tumorales se aprovechen del nicho que ya había sido creado por los CAF u otros componentes de la matriz extracelular para la expansión colonial.<sup>[14]</sup> [17] [30]



**Figura 19.** El nicho de células madre y otros tipos celulares circundantes (fibroblastos, células inmunitarias y endotelio) regulan estrechamente la homeostasis de la cripta colónica.<sup>[26]</sup>



**Figura 20.** Mecanismos para adquirir las características del cáncer.<sup>[40]</sup>

## 7.5. Terapias específicas frente a los CAFs.

La mayoría de los mecanismos de resistencia documentados y frente a los que se ha actuado hasta ahora, se hallan dentro de las células tumorales. Sin embargo, sigue habiendo un alto porcentaje de recidivas en el cáncer de colon. Para entender este fenómeno, se ha estudiado cómo el microentorno tumoral influye tanto en el desarrollo de la proliferación inicial del tumor como en la aparición de resistencia al tratamiento, ya que podría resultar ser una gran diana terapéutica. Sin embargo, la administración de agentes terapéuticos al estroma podría ser problemática debido a la existencia de estructuras vasculares insuficientes y defectuosas, hipoxia y alteraciones del pH. Hasta ahora, se han probado algunos fármacos con dispares resultados.

Vamos a ver algunos de ellos con mayor detalle, a modo de ejemplo del estado actual de las investigaciones en este campo, y como postulación de posibles nuevas vías.

La quimioterapia ha sido un tratamiento básico, vital y generalizado para el cáncer colorrectal durante muchos años. Sin embargo, la quimiorresistencia se ha convertido en un importante problema. Inicialmente, se atribuyó a la presencia de diversas alteraciones genéticas como mutaciones genéticas, amplificación génica, cambios epigenéticos que influyen en la captación, metabolismo o exportación de fármacos de células individuales, o alteraciones en las vías de señalización que protegen las células madre tumorales. Pero últimamente el microambiente tumoral se está situando en el punto de mira.<sup>[15]</sup> La matriz extracelular remodelada por acción de los CAFs, tiene un profundo impacto en la resistencia a la quimioterapia, ya que forma una barrera física responsable de que la mayoría de los fármacos contra el cáncer muestren una penetración limitada en tumores sólidos. Y una vez que las células cancerosas se han unido a ella, adquieren quimiorresistencia a través de la activación de diversas vías de señales de supervivencia.<sup>[30]</sup> Los estudios llevados a cabo con los inhibidores de la metaloproteinasa de la matriz hasta el momento habían mostrado un gran potencial terapéutico, por lo que se desarrollaron varios inhibidores de la panproteasa, como tanomastat, marimastat y prinomastat. Sin embargo, estos agentes no mostraron una mayor respuesta respecto al tratamiento estándar en múltiples formas de cáncer. Retrospectivamente, se intentaron explicar estos resultados, y es que aunque las metaloproteinasas de la matriz están casi sobreexpresadas en los tumores humanos, es probable que su acción sea más importante en los tumores en estadio precoz que en los tumores que ya están en estadio avanzado. Por lo que los esfuerzos actuales se centran en el desarrollo de MMPIs más selectivos basados en los tipos y etapas del cáncer.<sup>[14] [17] [24]</sup>

Asimismo, también se ha observado que los fibroblastos asociados al cáncer de colon que han recibido tratamiento quimioterápico, desarrollan una mayor secreción de citoquinas y quimioquinas específicas, como IL-17A, que aumenta el número de células madre cancerígenas resistentes a la quimioterapia. Por lo que esta puede ser una interesante vía de estudio a seguir en el futuro.<sup>[30]</sup>

Un estudio reciente liderado por el Dr. Li y sus colaboradores ha mostrado que el fármaco quimioterápico oxaliplatino aumenta la acumulación de CAFs, lo que puede, en cierta medida, ser responsable de la resistencia a fármacos. Se vio que la administración conjunta de oxaliplatino con el inhibidor de la dipeptidil peptidasa PT-100, que inhibe los CAF al actuar frente a la proteína de activación de los fibroblastos

(FAP), reduce notablemente la acumulación de CAFs, suprime significativamente el crecimiento del tumor y aumenta la supervivencia, de manera que mejora la respuesta a la quimioterapia, reduce el reclutamiento de células promotoras de tumores inmunes e inhibe la angiogénesis.<sup>[15]</sup>

Otro factor que provoca quimiorresistencia es el PDGF. Como ya hemos visto, el PDGF controla el nivel de presión intersticial del fluido (IFP), la cual es mayor en tumores sólidos, suponiendo un obstáculo para la liberación eficaz del fármaco y disminuyendo la eficacia de la quimioterapia. Estudios han mostrado que el tratamiento con antagonistas de los receptores de PDGF disminuye la IFP en los tumores y aumenta la captación de los agentes quimiotóxicos. En consecuencia, la eficacia de la quimioterapia es mucho mayor.<sup>[16]</sup>

Un estudio del Dr. Bai y sus colaboradores puso de manifiesto la participación del microentorno en la tumorogénesis, específicamente de los CAFs. La inducción tumoral mediante la administración de azoximetano y dextrano con sulfato de sodio a ratones, provocó una intensa inflamación de la mucosa colorrectal y la acumulación intratumoral de CAFs por la expresión aumentada de FGF-1 y FGF-3, y la fosforilación mejorada de FGFR4. De lo que se deduce que la inhibición de la vía de señalización de FGF puede ser una estrategia útil para el tratamiento del cáncer de colon.<sup>[34]</sup>

También se ha descrito que EGF y FGF fomentan el crecimiento del tumor y su estroma, ambos factores son secretados por los CAFs. La mayoría de los cánceres epiteliales expresan receptores de EGF (EGFR), y los inhibidores de EGFR se han utilizado con éxito para tratar los cánceres que son EGFR+, incluyendo cetuximab en el cáncer de colon.<sup>[26]</sup>

Pero como ya se ha comentado, los CAFs también pueden actuar de manera indirecta modulando los elementos adyacentes. Frente a estas acciones también se ha investigado:

- En la angiogénesis, VEGF es el factor implicado más importante. Varios inhibidores de VEGF están en ensayos de fase I o II para el cáncer de colon. Un ejemplo es Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra VEGF-A. Se une al VEGF y, por tanto, evita su interacción con el receptor de VEGF, lo que conduce a la inhibición de la angiogénesis. Actualmente la FDA ha aprobado bevacizumab para ser usado en cáncer metastásico de colon.<sup>[14] [17] [24]</sup> Además, se ha visto que el tratamiento con IFN-γ disminuye la expresión de VEGF en CAFs, reduciendo la angiogénesis y, por tanto, la proliferación tumoral.<sup>[24]</sup>

Aunque hay que ser precavidos ya que parece ser que los tumores pueden hacerse refractarios a la terapia anti-VEGF en un microambiente proinflamatorio, esto requiere una mayor investigación.<sup>[14] [17] [24]</sup> También se ha descrito que la terapia antiangiogénica con un inhibidor de la tirosina quinasa VEGFR (TKI) a dosis supraclínicas, aumenta la invasividad y la metástasis tumoral.<sup>[14]</sup>

- Frente a la inflamación crónica, recientes ensayos clínicos han mostrado que el bloqueo de la COX-2 tiene un potencial quimiopreventivo contra el cáncer de colon.<sup>[24]</sup> También se están estudiando inhibidores y anticuerpos contra las citoquinas inflamatorias o sus receptores, como la reparixina, un inhibidor del receptor de IL8, interleucina cuyos altos niveles expresados por el epitelio tumoral constituyen un círculo vicioso que promueve el crecimiento y la proliferación tumoral.<sup>[24] [37]</sup>

Una nueva estrategia que se está investigando es la vacunación con células tumorales que expresan FAP. Hasta ahora se ha visto que es capaz de eliminar tumores sólidos y tumores resultantes de la diseminación hematógena, y reducir notablemente el número de CAFs en el interior de los tumores. Esta respuesta inmune antitumoral es mediada por células T CD8 +, de manera que aumenta la infiltración de linfocitos T CD8 + y suprime la acumulación de células inmunosupresoras en el microentorno tumoral. Hay que continuar investigando esta vía, porque puede tener importantes implicaciones en el uso clínico de células tumorales modificadas genéticamente como vacunas contra el cáncer.<sup>[30] [41]</sup>

Como podemos ver, hay muchas vías de investigación abiertas, y otras tantas que todavía no hemos descubierto, por lo que el futuro es sin duda, prometedor.

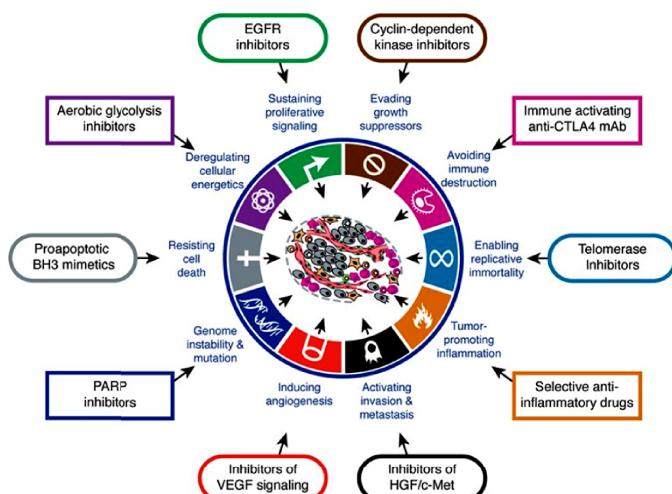


Figura 21. Objetivo terapéutico de las características del cáncer.<sup>[23]</sup>

## **8. Conclusiones.**

A pesar de los enormes avances hechos en cuanto al conocimiento sobre qué son, de dónde provienen y cómo actúan los fibroblastos asociados al cáncer, todavía quedan muchos aspectos que desconocemos o cuya magnitud no llegamos a comprender. Pero que sin duda, suponen un gran e interesante reto a explorar.

En mi opinión, y creo que se puede decir sin ninguna duda ante todos los hechos que lo avalan, los CAFs son un elemento crucial en la proliferación e invasión tumoral. Se ha descrito que se encuentran localizados preferentemente en el borde tumor – estroma, constituyendo un frente de invasión tumoral. Como hemos visto, participan en todas y cada una de las “etapas” del desarrollo tumoral, y de múltiples formas distintas. Lo que aumenta enormemente la posibilidad de desarrollar resistencias a los sucesivos tratamientos existentes y que se vayan a ir descubriendo con el tiempo, pero que a su vez supone una gran vía de posibilidades para encontrar nuevos fármacos.

Después de revisar múltiples artículos, y de ver todos los hechos que sustentan las diferentes teorías, yo defiendo que tienen un origen heterogéneo. Es decir, no proceden de un único tipo de célula o tienen un único mecanismo de activación, sino que se dan varios (o todos) simultáneamente, predominando unos u otros en cada tipo de cáncer o en cada sujeto diferencialmente. Igualmente, pueden activarse (y por tanto, inactivarse) de múltiples formas, algunas de ellas todavía desconocidas hasta la fecha. Lo que como ya he dicho, dará lugar a futuros proyectos de investigación.

Debido a sus diversas acciones, los CAF pueden ser un marcador útil para predecir la recurrencia de la enfermedad. Si están presentes, y sobre todo en gran cantidad, el pronóstico será peor, puesto que pondrán en marcha toda su maquinaria y promoverán el progreso tumoral, así como el desarrollo de metástasis. Y por lo tanto, deberemos ser más agresivos en su tratamiento para prevenir futuras recidivas.

En cuanto a las posibles líneas futuras de trabajo, deben investigarse todas y cada una de las vías comentadas, pero en mi opinión, deberíamos dirigir más esfuerzos, o al menos a corto plazo, sobre todo en aquellas moléculas o factores que han demostrado una mayor eficacia hasta la fecha, o aquellos que por estar incluidos un menor número de moléculas o por ser sus acciones más simples, podemos hallar un resultado favorable con mayor facilidad, aparentemente al menos. Por esto, a pesar de la gran importancia que hemos visto que tiene TGF- $\beta$ , concentraría mis esfuerzos

en conocer cómo actúa pero no tanto en desarrollar fármacos frente a él por el momento, hasta no dilucidar mejor su complejo mecanismo de acción; al igual que ocurre con las metaloproteinasas. En cambio, la terapia frente a VEGF o PDGF parece estar mostrando resultados muy satisfactorios, así que ahí sí que profundizaría más, por la mayor posibilidad de obtener antes unos resultados favorables. Asimismo, el hecho de tener un funcionamiento tan complejo hace que existan múltiples posibilidades en cuanto a las resistencias que pueden desarrollar, por lo que todo parece indicar que el futuro se halla en el desarrollo de terapias combinadas que aumenten la eficacia del tratamiento, al actuar frente a diversas vías de manera simultánea. Otro aspecto que merece la pena estudiar con mayor detalle es la inhibición no ya de los efectos que producen los CAFs, sino de su activación, para erradicar el problema desde el principio, ese sí que sería un gran logro en la batalla frente al cáncer.

Pero la investigación no debe centrarse únicamente en comprender su funcionamiento o hallar un fármaco eficaz; sino que también es interesante estudiar la posibilidad de encontrar moléculas que puedan prevenir su aparición, como es el caso del bloqueo de la COX-2. Por lo que esta es una vía en la que también merece la pena profundizar más.

Además de todo esto, debemos pensar en la posibilidad de que debido a la complejidad del proceso y a los numerosos elementos implicados en el mismo, nunca lleguemos a encontrar una cura, sino una cronificación de la enfermedad. Por lo tanto, merece la pena investigar la posibilidad de hallar la forma de que el paciente pueda convivir con su cáncer de colon, de lograr limitarlo por ejemplo, aunque no podamos eliminarlo, dejarlo aislado de manera que no pueda crecer ni invadir las estructuras adyacentes, y por tanto, el paciente pueda vivir con un impacto mínimo en su calidad de vida.

## 9. Referencias.

- [1]. Ellis H. Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery*. 2010;29(1):1-4.
- [2]. Szereszwska J. Anatomía quirúrgica del colon. En: Galindo F, et al, editores. Enciclopedia de Cirugía Digestiva. Tomo III. 1<sup>a</sup> ed. Argentina: Sociedad Argentina de Cirugía Digestiva; 2009. P. 301-306.
- [3]. Embriología basada en aparatos y sistemas. Aparato digestivo. En: Langman, Sadler TW, editores. Embriología médica. 11<sup>a</sup> ed. España: Lippincott, Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health; 2009. P. 209-234.
- [4]. Mik M, Berut M, Dziki L, Trzcinski R, Dziki A. Right- and left-sided colon cancer – clinical and pathological differences of the disease entity in one organ. *Arch Med Sci*. 2017 Feb 1;13(1):157-162. Epub 2016 Marzo 16.
- [5]. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. The worse prognosis of right-sided compared with left-sided colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Surg*. 2016 Marzo;20(3):648-655. Epub 2015 Nov 16.
- [6]. Órganos, aparatos y sistemas. Aparato gastrointestinal. En: Wheater, Young B, Heath JW, et al, editores. Histología funcional. Texto y atlas en color. 4<sup>a</sup> ed. Madrid: Harcourt; 2000. P. 249-273.
- [7]. Aparato digestivo II: esófago, estómago e intestino. En: Ross MH, Pawlina W, editores. Histología. Texto y atlas color con Biología celular y molecular. 5<sup>a</sup> ed. China: Panamericana; 2007. P. 562-623.
- [8]. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. [Internet]. Vigo. Atlas de histología vegetal y animal. Disponible en: <https://mmeigas.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-grueso.php?pagina=20>
- [9]. Aparato digestivo. En: Welsch U, Sobotta J, editores. Histología. 2<sup>a</sup> ed. Madrid: Panamericana; 2009. P. 337-406.
- [10]. Turner JR, Lingen MW. Cavidad oral y tubo digestivo. En: Robbins, Kumar, Abbas, Aster, editores. Patología humana. 9<sup>a</sup> ed. Barcelona: Elsevier España; 2013. P. 551-562.
- [11]. Choi Y, Sateia HF, Peairs KS, Stewart RW. Screening for colorectal cancer. *Semin Oncol*. 2017 Feb;44(1):34-44.
- [12]. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010 Mayo;74(2):106-133.
- [13]. Balaguer F, Piñol V, Castells A. Cáncer colorrectal. En: Montoro MA, García JC, editores. Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. 2<sup>a</sup> ed. Madrid: Jarpyo Editores; 2012. P. 617-626.
- [14]. Juntila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013 Sept 19;501(7467):346-354.
- [15]. Li M, Li M, Yin T, Shi H, Wen Y, Zhang B, et al. Targeting of cancer-associated fibroblasts enhances the efficacy of cancer chemotherapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Med Rep*. 2016 Marzo;13(3):2476-2478. Epub 2016 Feb 4.

- [16]. Micke P, Östman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy?. *Lung Cancer*. 2004 Aug;45 Supl 2:S163-175.
- [17]. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2010 Enero 1;15:166-179.
- [18]. Takigawa H, Kitadai Y, Shinagawa K, Yuge R, Higashi Y, Tanaka S, et al. Multikinase inhibitor regorafenib inhibits the growth and metastasis of colon cancer with abundant stroma. *Cancer Sci*. 2016 Mayo;107(5):601-608. Epub 2016 Marzo 18.
- [19]. Patología de los sistemas básicos: Tubo digestivo. En: Wheater, Stevens A, Lowe JS, Young B, editores. *Histopatología básica. Atlas y texto en color*. 4<sup>a</sup> ed. Madrid: Elsevier España; 2003. P. 134-153.
- [20]. Sistema digestivo. En: Stevens A, Lowe J, Scott I, Damjanov I, editores. *Patología clínica*. 3<sup>a</sup> ed. México: El Manual Moderno; 2011. P. 249-271.
- [21]. 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 Oct;8(7):1290-1305. Epub 2014 Mayo 6.
- [22]. Karagiannis GS, Schaeffer DF, Cho CKJ, Musrap N, Saraon P, Batruch I, et al. Collective migration of cancer-associated fibroblasts is enhanced by overexpression of tight junction-associated proteins claudin-11 and occludin. *Mol Oncol*. 2014 Marzo; 8(2):178-195. Epub 2013 Nov 8.
- [23]. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Marzo 4;144(5):646-674.
- [24]. Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*. 2010 Oct 15;316(17):2713-2722. Epub 2010 Mayo 6.
- [25]. Attieh Y, Vignjevic DM. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Eur J Cell Biol*. 2016 Nov;95(11):493-502. Epub 2016 Agosto 22.
- [26]. Chen S, Huang EH. The colon cancer stem cell microenvironment holds keys to future cancer therapy. *J Gastrointest Surg*. 2014 Mayo;18(5):1040-1048. Epub 2014 Marzo 19.
- [27]. Mills SE, Sternberg S. Musculoskeletal system. En: Mills SE, editor. *Histology por pathologists*. 3<sup>a</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. P. 124-157.
- [28]. Herrera M, Islam ABM, Herrera A, Martín P, García V, Silva J, et al. Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res*. 2013 Nov 1;19(21):5914-5926. Epub 2013 Sept 19.
- [29]. Pankova D, Chen Y, Terajima M, Schliekelman MJ, Baird BN, Fahrenholz M, et al. Cancer-associated fibroblasts induce a collagen cross-link switch in tumor stroma. *Mol Cancer Res*. 2016 Marzo;14(3):287-295. Epub 2015 Dic 2.
- [30]. Mukaida N, Sasaki S. Fibroblasts, an inconspicuous but essential player in colon cancer development and progression. *World J Gastroenterol*. 2016 Junio 21;22(23):5301-5316.

- [31]. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, de Wever O. Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Front Oncol.* 2015 Marzo 23;5:63.
- [32]. Hawinkels LJAC, Paauwe M, Verspaget HW, Wiercinska E, van der Zon JM, van der Ploeg K, et al. Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF- $\beta$  signaling in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene.* 2014 Enero 2;33(1):97-107. Epub 2012 Dic 3.
- [33]. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DVF, Iglesias M, Céspedes MV, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-  $\beta$ -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell.* 2012 Nov 13;22(5):571-584.
- [34]. Bai YP, Shang K, Chen H, Ding F, Wang Z, Liang C, et al. FGF-1/3/FGFR4 signaling in cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in colon cancer through Erk and MMP-7. *Cancer Sci.* 2015 Oct;106(10):1278-1287. Epub 2015 Sept 4.
- [35]. Herrera A, Herrera M, Alba-Castellón L, Silva J, García V, Loubat-Casanovas J, et al. Protumorigenic effects of snail-expression fibroblasts on colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2014 Junio 15;134(12):2984-2990. Epub 2013 Nov 29.
- [36]. Pallangyo CK, Ziegler PK, Greten FR. IKK $\beta$  acts as a tumor suppressor in cancer-associated fibroblasts during intestinal tumorigenesis. *J Exp Med.* 2015 Dic 14;212(13):2253-2266. Epub 2015 Nov 30.
- [37]. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato T, 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 Enero 21;110(2):469-478. Epub 2013 Dic 17.
- [38]. Ferrer-Mayorga G, Gómez-López G, Barbáchano A, Fernández-Barral A, Peña C, Pisano DG, et al. Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. *Gut.* 2017 Agosto;66(8):1449-1462. Epub 2016 Abril 6.
- [39]. Huang L, Xu AM, Liu S, Liu W, Li TJ. Cancer-associated fibroblasts in digestive tumors. *World J Gastroenterol.* 2014 Dic 21;20(47):17804-17818.
- [40]. Sheer D. Barts and the london school of medicine and dentistry. Presentation of Molecular foundations of cancer; 2014 Abril 26. London.
- [41]. Chen M, Xiang R, Wen Y, Xu G, Wang C, Luo S, et al. A whole-cell tumor vaccine modified to express fibroblast activation protein induces antitumor immunity against both tumor cells and cancer-associated fibroblasts. *Sci Rep.* 2015 Sept 23;5:14421.

## 10. Anexos.

Anexo 1. Expresión de marcadores por parte de los CAFs. [Elaboración propia]

MARCADORES	EXPRESIÓN
α-SMA	+
Vimentina	+
Desmina	+
FAP	+
FSP1 (S100A4)	+
HGF	+
SDF-1	+
TGF-β	+
PDGFR (α y β)	+
Snail-1	+
Citoqueratina	-
CD-31	-

Anexo 2. Drogas potencialmente dirigidas a CAFs.<sup>[17]</sup>

Target factor	Expression cell	Function	Drug	Mechanism	Clinical Trial	Reference
VEGF	tumor cells CAFs, TAMs.	Angiogenesis	Bevacizumab	Neutralization VEGF	Phase II	(119)
			Adsfilt	Interception of VEGF	Preclinical	(120)
			IMC-1C11	anit-VEGFR-2 antibody	Phase I	(121)
			RPI-4610	anti-VEGFR-1 ribozyme	Phase II	(122)
Tenascin-C	CAFs, cancer cells	cell adhesion	81C6	radioimmunotherapy	Phase II	(113)
			ATN-RNA	siRNA	Phase I	(123)
FAP	CAFs, TECs, cancer cells	Serine protease	PT-100	activity inhibitor	Phase I	(124)
			Sibrotuzumab	anti-FAP antibody	Phase I	(125)
			Sc40-FasL	induce apoptosis of FAP <sup>+</sup> cells	preclinical	(126)
			Rebimastat	activity inhibitor	Phase III	(127)
CTGF	CAFs, TECs, cancer cell, neural	Growth factor	FG-3019	anti-CTGF antibody	preclinical	(128)
			DN-9693	degrade mRNA	preclinical	(129)
MMPs	CAFs, TECs, TAMs, cancer cells	metalloproteinases	Marimastat	activity inhibitor	Phase III	(130)
			Tanomastat	activity inhibitor	Phase III	(131)
			Rebimastat	activity inhibitor	Phase III	(127)
uPA	CAFs, TAMs, cancer cells	Serine protease	PAI-2	activity inhibitor	preclinical	(132)
			uPA-UT1	activity inhibitor	preclinical	(133)
CA IX	CAFs, cancer cells	Carbonic anhydrase	Rencarex WX-G250	induce ADCC	Phase III	(134)