

TRABAJO FIN DE GRADO



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Grado en Medicina

Expresión inmunohistoquímica de macrófagos CD14 y
CD163 en el carcinoma colorrectal

Autor: Ana Moreno Méndez

Director: Dr. José García Solano

Murcia, Mayo de 2023

TRABAJO FIN DE GRADO



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Grado en Medicina

Expresión inmunohistoquímica de macrófagos CD14 y
CD163 en el carcinoma colorrectal

Autor: Ana Moreno Méndez

Director: Dr. José García Solano

Murcia, Mayo de 2023

TRABAJO FIN DE GRADO



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

DEFENSA TRABAJO FIN DE GRADO

DATOS DEL ALUMNO	
Apellidos: Moreno Méndez	Nombre: Ana
DNI: 24454768H	Grado Medicina
Facultad Ciencias de la Salud	
Título del trabajo: "Expresión inmunohistoquímica de macrófagos CD14 y CD163 en el carcinoma colorrectal".	

El Dr. José García Solano tutor del trabajo reseñado arriba, acredito su idoneidad y otorgo el V. ° B. ° a su contenido para ir a Tribunal de Trabajo fin de Grado.

En Murcia, a 8 de Mayo de 2023

Fdo.: Dr. José García Solano

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias en primer lugar a mi tutor, José García Solano, por guiarme y ayudarme, en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Santa Lucía de Cartagena. Sin ellos no habría sido posible el desempeño de este Trabajo de Fin de Grado.

También quiero agradecer la ayuda de José Antonio García Córdoba, profesor de estadística de la Universidad Politécnica de Cartagena. Encontrarme con él y que me ofreciera su ayuda con el análisis estadístico fue como un milagro para mí.

Mi más sincero agradecimiento a todo el personal del Grado en Medicina de la UCAM, en especial a los profesores, y también a los tutores y demás sanitarios del Hospital Santa Lucía por todos los conocimientos que me han otorgado durante estos 6 años. Mención especial a la Dra. Juana Flores Torrecillas, por su gran interés en la docencia y por apoyarme durante mi paso por el Centro de Salud Casco Antiguo.

Gracias a mis amigos de la universidad con los que he podido contar en todo momento. A mi pareja por su apoyo incondicional durante toda la carrera. A mi abuela por el cariño que siempre me da y por estar siempre ahí. Y por último, pero más importante, quiero dar las gracias a mis padres porque sin ellos no habría llegado a ser quien soy y a estar donde estoy ahora.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El carcinoma colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más prevalentes a nivel mundial. El microambiente tumoral resulta crucial en su desarrollo, y dentro de él los macrófagos juegan un papel muy importante. La expresión de macrófagos CD14 y CD163, entre otras expresiones antigénicas, pueden servir como biomarcadores pronósticos del CCR y como dianas para el desarrollo de nuevas terapias. El objetivo de este estudio es ver la expresión inmunohistoquímica (IHQ) de macrófagos CD14 y CD163 en 40 casos de CCR y relacionarla con características clínicas, los subtipos histológicos más frecuentes y con datos histológicos de valor pronóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se han confeccionado TMA's sobre un total de 40 casos de CCR del Servicio de Anatomía Patológica de un hospital del Área II de la Región de Murcia, para valorar la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163. Se ha estudiado también la relación de esta expresión con datos clínicos e histológicos de valor pronóstico y con los subtipos histológicos más frecuentes.

RESULTADOS: Se ha observado cierta tendencia a la significación estadística de la expresión de macrófagos CD14+ en relación con los subtipos histológicos ($p=0,052$), viéndose mayor expresión en los CCR MSI-H, aunque sí se han visto diferencias significativas en la expresión de macrófagos CD163+ en relación con el mismo subtipo de CCR ($p=0,008$ y $p=0,038$). También se han visto diferencias significativas en la relación de la expresión de CD14 con respecto al *tumor budding* ($p=0,008$).

CONCLUSIÓN: Este estudio muestra la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 en 40 casos de CCR. Hay resultados controvertidos con respecto a la expresión de ambos antígenos en relación con el CCR MSI-H. Sin embargo, hemos podido observar que hay relación en la expresión de macrófagos CD14+ con el *tumour budding*, lo que supone un gran hallazgo con significado pronóstico y terapéutico.

DESCRIPTORES: neoplasias colorrectales, microambiente tumoral, macrófagos, pronóstico.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Colorectal carcinoma (CCR) is one of the most prevalent tumours worldwide. The tumour microenvironment is crucial in its development and within it, macrophages play a very important role. The expression of CD14 and CD163 macrophages, among other antigenic expressions, can serve as prognostic biomarkers of CCR and as targets for the development of new therapies. The objective of this study is to observe the immunohistochemical (IHQ) expression of CD14 and CD163 macrophages in 40 cases of CCR and relate it to clinical characteristics, the most frequent histological subtypes and histological data of prognostic value.

MATERIALS AND METHODS: TMAs have been prepared for a total of 40 cases of CCR from the Pathologic Anatomy Service of a hospital in Area II of the Región de Murcia to evaluate the IHQ expression of CD14 and CD163 macrophages. The correlation of this expression with clinical and histological data of prognostic value and the most frequent histological subtypes has also been studied.

RESULTS: A certain trend towards statistical significance of CD14+ macrophage expression has been observed in relation to histological subtypes ($p=0.052$), with higher expression seen in MSI-H CCRs, although significant differences have been observed in the expression of CD163+ macrophages in relation to the same CCR subtype ($p=0.008$ and $p=0.038$). Significant differences have also been observed in the correlation of CD14 expression with tumour budding ($p=0.008$).

CONCLUSION: This study shows the IHQ expression of CD14 and CD163 macrophages in 40 cases of CCR. There are controversial results regarding the expression of both antigens in relation to MSI-H CCR. However, we have been able to observe a correlation between the expression of CD14+ macrophages with tumour budding, which represents a significant finding with prognostic and therapeutic implications.

KEYWORDS: colorectal neoplasms, tumour microenvironment, macrophages, prognostic.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- CCR: Carcinoma colorrectal.
- CC: Carcinoma convencional.
- CS: Carcinoma serrado.
- MSI-H: Carcinoma con inestabilidad de microsatélites.
- EED: Extensión extramural discontinua.
- PCT: Patrón de crecimiento tumoral.
- TB: *Tumour budding*.
- MAT: Macrófagos asociados al tumor.
- IHQ: Inmunohistoquímica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
4. RESULTADOS.....	11
5. DISCUSIÓN.....	13
6. AUTOCRÍTICA DEL TRABAJO.....	17
7. CONCLUSIONES.....	19
8. ANEXOS.....	21
9. BIBLIOGRAFÍA.....	23
10. TABLAS.....	27
11. FIGURAS.....	33

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más frecuentes a nivel mundial, siendo el tercero más diagnosticado después del cáncer de mama y de pulmón, y el segundo en mortalidad por detrás del cáncer de pulmón ¹.

En cuanto a supervivencia el CCR se acerca al 60%, siendo mayor en la localización rectal y en mujeres. Este tipo de cáncer es mucho más frecuente en países con alto desarrollo económico, sobre todo en aquellos donde la prevalencia de sobrepeso y obesidad es alta. El principal factor de riesgo es la edad como en la mayoría de los cánceres, apareciendo con más frecuencia entre la quinta y la séptima décadas de la vida. A este hay que sumarle otros factores de riesgo como son el consumo de embutidos, carne roja, alcohol, tabaquismo, antecedentes familiares de cáncer colorrectal, antecedentes personales de adenomas colorrectales o enfermedad inflamatoria intestinal, el sedentarismo y la obesidad. Por otro lado, se ha visto que el ejercicio físico tiene un efecto protector. También hay formas hereditarias de CCR, las cuales representan el 5% de todos los casos ^{2,3}.

Algunos de los síntomas que nos pueden hacer sospechar este tipo de cáncer pueden ser los cambios en los hábitos intestinales, anemia, hematoquecia y dolor abdominal ³.

SUBTIPOS HISTOLÓGICOS

El CCR no es un adenocarcinoma homogéneo. Hay varios subtipos histológicos reconocidos por la OMS como son el adenocarcinoma de tipo convencional o NOS, el adenocarcinoma serrado y el carcinoma con inestabilidad de microsatélites alta esporádico. Cada uno de ellos muestra una ruta carcinogénica, un pronóstico y un tratamiento distinto.

El adenocarcinoma convencional (CC) supone alrededor del 80% de todos los CCR, siendo por tanto el subtipo más frecuente. Se origina a partir de

las células epiteliales que recubren la superficie interna del colon y del recto. Se caracteriza por presentar células tumorales glandulares formando estructuras tubulares o papilares ³.

Los carcinomas serrados representan el 10% de todos los casos. Se caracterizan por la presencia de glándulas alargadas y ramificadas, lo cual le da un aspecto serrado al tumor. Se han asociado con mayor tendencia a la recurrencia y a la diseminación a través de las mucosas y tienen peor pronóstico que los CC ^{3,4}.

Los carcinomas con inestabilidad de microsatélites (MSI-H) representan aproximadamente el 15% de todos los casos. Este se caracteriza por la presencia de mutaciones en los genes reparadores del ADN. En los CCR MSI-H BRAF-wildtype se ha relacionado con una mejor respuesta a la inmunoterapia y una mejor supervivencia en relación con otros tipos de cáncer^{3,5}.

Además del TNM, hay importantes factores histológicos que determinan la gravedad del tumor como la invasión linfática, vascular y perineural, la extensión extramural discontinua (EED), el patrón de invasión o crecimiento tumoral (PCT) y la gemación tumoral o *tumour budding* (TB). La EED se define como la existencia de depósitos tumorales más allá del frente invasor, en la grasa pericolónica, sin relación con ganglios linfáticos. El PCT se refiere a la forma de invasión del cáncer en su frente invasor, clasificándose en frente invasor expansivo y frente invasor infiltrativo ⁶. El TB hace referencia a la presencia de células tumorales aisladas o en pequeños grupos sólidos de menos de 4 células que se sitúan en el frente invasivo del tumor. Un alto grado de TB se ha asociado con peores resultados en varios subtipos de CCR ³.

Las metástasis son la principal causa de morbilidad y mortalidad asociada al cáncer. El desarrollo de estas metástasis viene determinado por la participación tanto de las alteraciones genómicas como del microambiente tumoral ⁷.

MICROAMBIENTE TUMORAL

Las células tumorales inmunogénicas son expuestas al sistema inmune del huésped, el cual las reconoce y restringe su crecimiento. Esto hace que en estadios iniciales del desarrollo del cáncer estas células sean más vulnerables. Sin embargo, conforme se va desarrollando el tumor, este adquiere múltiples mecanismos de defensa para intentar evadir este sistema inmune y lo hace gracias al microambiente que se forma a su alrededor⁷. En este microambiente podemos encontrar células tumorales y no tumorales, como células inmunes, fibroblastos, adipocitos y células endoteliales^{7,8}.

Los monocitos circulantes por el torrente sanguíneo llegan al estroma tumoral y se activan dando lugar a los macrófagos, que representan una de las células inmunes más importantes que infiltran el microambiente tumoral, sobre todo en el colon. Los macrófagos activados pueden ser de dos tipos: los macrófagos M1 y los M2. Los macrófagos M1 se relacionan con la defensa del huésped contra las infecciones bacterianas y virales y la actividad antitumoral. Los macrófagos M2 intervienen en la eliminación de desechos, la angiogénesis, la remodelación y la reparación de los tejidos dañados, así como la progresión tumoral, es decir facilitan tanto el crecimiento del tumor primario como su diseminación hacia otros órganos^{7,8}.

La mayor parte de macrófagos (MAT: macrófagos asociados al tumor) que invaden este microambiente tumoral presentan características fenotípicas del subtipo M2. Un gran infiltrado de MAT en ciertos tumores sólidos, como los de pulmón, estómago y mama triple negativo, parece que se asocia a peor pronóstico en términos de supervivencia total, supervivencia libre de enfermedad y desarrollo de metástasis linfáticas y a distancia^{9,10}, aunque en el caso del CCR no está clara esta asociación¹¹.

Los MAT incluyen la expresión de antígenos como el CD14 o el CD163 entre otros. Dicha expresión la podemos estudiar mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ)⁸. Los macrófagos CD14+ tienden a situarse

mayoritariamente en el frente invasor del tumor y parece que una mayor expresión de dichos macrófagos se relaciona con mejor pronóstico. Esta activación de macrófagos CD14+ podría tenerse en cuenta para el desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas ¹². Por otro lado, los macrófagos CD163+ pertenecen al subtipo de macrófagos M2, los cuales tienen actividad antiinflamatoria, y parece que están relacionados con un frente invasor activo y con mal pronóstico. Este marcador CD163 puede utilizarse por tanto como un biomarcador para predecir el pronóstico de los pacientes ^{11,13-16}.

En resumen, el estudio de la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 puede tener relevancia a la hora de determinar el pronóstico de pacientes con CCR y para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

En este estudio se ha investigado, en 40 casos de CCR, la presencia de macrófagos con expresión IHQ de CD14 y CD163 utilizando micromatrices de tejido (TMA) y hemos analizado la relación de dicha expresión con características clínicas (sexo, edad y localización tumoral), los subtipos histológicos de CCR más frecuentes (CC, CS Y MSI-H) y con datos histológicos de valor pronóstico (TNM, EED, PCT Y TB). A continuación se exponen los objetivos del estudio.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO PRINCIPAL:

1. Observar si existe expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 en el frente invasor de los CCR.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

2. Observar si la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 está en relación con datos clínicos como sexo, edad y localización del tumor.
3. Observar si la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 está en relación con los principales subtipos histológicos de CCR y es diferente en cada uno de ellos.
4. Observar si la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 está en relación con datos histológicos de valor pronóstico como TNM, EED, PCT Y TB.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio analítico observacional de corte transversal.

Selección de pacientes y material de estudio:

Las muestras utilizadas en este estudio se han obtenido del Servicio de Anatomía Patológica de un Hospital del Área II de la Región de Murcia. Utilizando la base de datos de este servicio (Pathwin), se han estudiado de manera retrospectiva un total de 280 CCR intervenidos quirúrgicamente entre los años 2015 y 2019. Estas muestras van a ser objeto de estudio en relación con una tesis doctoral. Los casos seleccionados para este trabajo corresponden al inicio de dicha tesis. Se ha iniciado el estudio con los 40 primeros pacientes de ese listado de 280 CCR tomados consecutivamente. De estos 40 casos de CCR 28 casos corresponden a carcinomas convencionales o de tipo NOS (CC), 8 a carcinomas serrados (CS) y 4 a carcinomas MSI-H esporádicos (MSI-H).

De los informes de Anatomía Patológica se han seleccionado los datos clínicos de los CCR edad y localización, y los datos histopatológicos de valor pronóstico como el TNM, la existencia o no extensión extramural discontinua (EED), la existencia de gemación tumoral o *tumor budding* (TB) y su grado (nulo o escaso: menos de 5 grupos tumorales / HPF y abundante: más de 5 grupos tumorales / HPF), el patrón de crecimiento tumoral (PCT) (expansivo/infiltrativo), la existencia o no de infiltrado macrofágico y su distinción en células macrofágicas fusiformes y células macrofágicas redondeadas.

Confección de TMAs:

Se han seleccionado del total de las preparaciones de cada caso, unas preparaciones modelo donde se observaba bien el frente invasor. Se marcaba un círculo en el cristal en la zona representativa de dicha muestra para posteriormente escoger esta zona en el bloque de parafina para su inclusión en micromatrices de tejido empleando el *Tissue Arrayer* (TMA) de Beecher. La confección de micromatrices de tejido se ha realizado según protocolo estándar¹⁷.

ESTUDIO IHQ DE MACRÓFAGOS CD14 Y CD163:

Posteriormente se realizaron cortes de 4 µm de cada TMA para realizar la tinción inmunohistoquímica con cada una de las dos proteínas a estudiar: CD14 y CD163. Este procedimiento se realiza en el equipo VENTANA, Benchmark, ULTRA (Roche) utilizando el Kit de Visualización Ventana® ultra View universal DAB Detection Kit (Roche, Ref 760-500). Después del desenmascaramiento antigénico a pH 9 durante 36 minutos a 95°C, los cortes se incubaron durante 32 minutos con cada uno de los anticuerpos anti-CD14 y anti-CD163. Para visualizar el antígeno se realizó un revelado con DAB (3,3 - diamino-benzidina).

Las micromatrices de tejido cortadas y teñidas con IHQ con las dos proteínas, fueron valoradas por un patólogo experto en patología digestiva (JGS) y por la autora del trabajo (AMM).

A la hora de evaluar el grado de positividad en cuanto al porcentaje de expresión dentro del fragmento de tejido seleccionado e intensidad de la misma se emplea un sistema que clasifica en cuatro grupos ambas variables (A, B, C y D). En cuanto al porcentaje de expresión, A se corresponde con una expresión que va del 0 al 5%, B de 5 a 50%, C de 50 a 75% y D de 75 al 100%. La intensidad también se clasifica con un sistema de cuatro letras, siendo A nula, B intensidad leve, C intensidad moderada y D intensa.

Para este trabajo se ha tenido en cuenta la existencia de dos tipos de infiltrados macrofágicos diferentes: por un lado el infiltrado de células macrofágicas fusiformes o estrelladas, y por otro lado el infiltrado de células macrofágicas redondeadas. También se ha considerado el infiltrado total de ambos tipos celulares. En la figura 1 se puede observar los dos tipos de infiltrado.

El resultado de las expresiones por IHQ de cada uno de los casos se han resumido con 4 números: 0 (no hay expresión), 1 (expresión leve), 2 (expresión moderada) y 3 (expresión intensa). Se ha considerado expresión débil ó nula

los números $< \text{ó} = 1$. Las expresiones >1 se han considerado moderadas/intensas. En las figuras 2.1 y 2.2 se pueden apreciar las distintas expresiones, desde una expresión nula a una expresión intensa.

Una vez obtenidos los resultados de expresión IHQ de las dos proteínas descritas, se ha estudiado su relación con los datos clínicos (Tabla 1), con los distintos subtipos histopatológicos de CCR (Tabla 2) y con los datos histopatológicos de valor pronóstico (Tabla 3).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para el análisis estadístico se ha empleado el programa IBM SPSS Statistics (Versión 20).

Se ha realizado un estudio descriptivo de las variables. Primero se han medido las frecuencias de cada una de ellas. Al ser variables cualitativas se han utilizado el test χ^2 (chi cuadrado) de Pearson y el test exacto de Fisher. Estos tests se han utilizado para ver si la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 tiene relación con los datos clínicos, los subtipos histológicos y los datos histológicos de valor pronóstico. Se ha hecho el estudio teniendo en cuenta de forma individual cada uno de los tipos de infiltrado (células macrofágicas fusiformes y células macrofágicas redondeadas), y por otro lado el infiltrado macrófagico total.

El test exacto de Fisher se ha utilizado en los casos en los que dentro de las celdillas 2x2 (o 2x3 en el caso de los subtipos histológicos) había una o más frecuencias menores a 5, mientras que el test χ^2 se ha utilizado cuando todas las frecuencias eran 5 o mayores.

4. RESULTADOS

Relación de la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 con los datos clínicos:

Los resultados del estudio IHQ de estos 40 casos se han relacionado con los datos clínicos de sexo, edad y localización del tumor (Tabla 1). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas de expresión de ambos marcadores CD14 y CD163 en relación con estos datos clínicos ($p > 0,05$).

Relación de la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 con los subtipos histológicos:

Los resultados del estudio IHQ de estos 40 casos se han relacionado con los principales subtipos histológicos de CCR: CC, CS y MSI-H (Tabla 2). En cuanto a la expresión de CD14, se han visto indicios de significación estadística en el infiltrado de células redondeadas ($p = 0,052$), observándose mayor expresión de esta proteína en los CCR de tipo MSI-H. Por otro lado, se han observado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CD163, tanto en el infiltrado de células macrofágicas redondeadas ($p = 0,008$) como en el infiltrado total ($p = 0,038$), viéndose también mayor expresión en MSI-H.

Relación de la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 con los datos histológicos de valor pronóstico:

Los resultados del estudio IHQ de estos 40 casos se han relacionado con los datos histológicos de valor pronóstico: TNM, EED, PCT y *Tumour Budding* (TB) o gemación tumoral (Tabla 3). No se han observado diferencias estadísticamente significativas de expresión de ambos marcadores en relación con TNM, EED y PCT ($p > 0,05$). Sin embargo, la expresión de CD14 del infiltrado macrofágico total, muestra diferencias estadísticamente significativas con la existencia de TB ($p = 0,008$), observándose más expresión de TB en los CCR donde la expresión de CD14 es más escasa.

5. DISCUSIÓN

El microambiente tumoral resulta muy importante en el desarrollo del CCR, y dentro de él los MAT representan las células inmunes importantes ^{7,8}. Como se ha comentado antes, se ha observado que en ciertos tumores sólidos un gran infiltrado de MAT se asocia a peores resultados de supervivencia y mayor desarrollo de metástasis, tanto linfáticas como a distancia ^{9,10}, aunque en el CCR no está clara dicha asociación, pero se sabe que hay varios fenotipos de MAT en el microambiente tumoral del frente invasor, cada uno con unos marcadores y unas funciones distintas¹¹. Estudios recientes han observado que los macrófagos con expresión CD14 en el frente invasor se relacionan con un mejor pronóstico¹², y que macrófagos con otro fenotipo como los que expresan CD163 en el frente invasor se relacionan con peor pronóstico en los CCR ^{11, 13-16}.

Por tanto, el estudio de dicho microambiente y en concreto de la expresión de ciertos MAT como los CD14+ y CD163+, se considera muy relevante para determinar el pronóstico de los pacientes con CCR y para el desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas. En este trabajo se ha investigado la relación de la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 con los datos clínicos, los subtipos histológicos más frecuentes de CCR y algunos datos histológicos de valor pronóstico.

Con respecto a la expresión IHQ de CD14 y CD163, no se han encontrado diferencias significativas en relación con las diferentes características clínicas (sexo, edad y localización tumoral). En el estudio de Katsuaki Inagaki et al ⁸ se estudia la relación de la expresión de macrófagos CD163 con diferentes características clínicas, entre las que se incluyen las mismas que en nuestro estudio y tampoco observaron diferencias significativas. Sin embargo, no se han encontrado trabajos que estudien la relación de la expresión de macrófagos CD14 con estas características.

En relación con los tres subtipos de CCR no se han observado diferencias estadísticamente significativas. No obstante, se observa una tendencia a la significación estadística entre la expresión de macrófagos redondeados CD14+ y los CCR MSI-H, lo cual concordaría con el buen pronóstico al que se asocia este subtipo de CCR ^{3,5}. En el estudio de Datian Chen et al ¹⁸ también se ha observado mayor expresión de CD14 en los carcinomas MSI-H. Sin embargo, en nuestro trabajo también hemos observado diferencias estadísticamente significativas en la expresión IHQ de macrófagos CD163, tanto en el infiltrado de células redondeadas como en el infiltrado macrofágico total en este tipo de CCR. Se ha comentado antes que esta expresión de CD163 parece relacionarse con peor pronóstico, lo que no concuerda con el resultado de la expresión de macrófagos CD14+, la cual se relaciona con mejor pronóstico. Probablemente esto se deba al pequeño tamaño muestral, ya que de los 40 casos de CCR, solo había 4 de MSI-H, por lo que habría que realizar un estudio con mayor tamaño muestral para ver con qué expresión se relaciona más este tipo de CCR.

Por último, en cuanto a los datos histológicos de valor pronóstico, se ha observado una relación estadísticamente significativa entre la expresión de macrófagos CD14+ del infiltrado total y el TB. Como es bien conocido, la alta expresión de TB en el frente invasor de un CCR está asociada a peor pronóstico, ya que se ha visto que es un predictor independiente de metástasis linfáticas y de peor supervivencia ^{3,19}. En nuestro trabajo hemos observado como los casos de CCR en los que hay poca o nula expresión de TB en el frente invasor se correlacionan con una alta infiltración de macrófagos CD14+, y al contrario, cuando en el frente invasor no hay expresión de macrófagos CD14+ o esta es muy escasa, la expresión de TB es muy alta. Este hallazgo es muy importante, porque podría ser objeto de desarrollo de dianas terapéuticas. El desarrollo y entrenamiento de macrófagos CD14+ en un frente invasor podría ser de gran ayuda para minimizar el desarrollo de TB en dicho frente, ya que es uno de los datos histopatológicos de valor pronóstico más importante, y para poder frenar la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis. Por otro lado, en el estudio de Kari Trumpi et al ²⁰ se observó que en el frente invasor

del tumor donde había áreas de TB, había mayor infiltrado de macrófagos CD163+, mientras que en nuestro trabajo no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en relación a dicha expresión de macrófagos CD163+ con este dato histológico. Como se ha mencionado antes, quizás aumentando el tamaño muestral podríamos llegar a ver también diferencias estadísticamente significativas en relación con esta expresión de macrófagos CD163+ y el TB.

6. AUTOCRÍTICA DEL TRABAJO

Este estudio es un preliminar de un estudio más grande con un mayor número de casos de CCR. Por tanto, teniendo en cuenta el pequeño tamaño muestral, hay que valorar los resultados con cautela. Sin embargo, se pueden observar resultados estadísticamente significativos que orientan a que en un estudio mayor y más exhaustivo pueden obtenerse unos datos muy relevantes.

Hay muchos estudios que hablan sobre la expresión IHQ de macrófagos CD163, mientras que de la expresión de macrófagos CD14 no se han encontrado tantos. Podría ser de gran interés también realizar más estudios de este marcador ya que nos orienta a que puede ser un predictor de buen pronóstico y podría ayudar al desarrollo de nuevas terapias.

7. CONCLUSIONES

1. Se ha observado expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 en estos CCR.
2. No se han visto diferencias estadísticamente significativas de esta expresión IHQ en relación con las diferentes características clínicas ($p > 0,05$).
3. En relación con los diferentes subtipos histológicos de CCR no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CD14, aunque hay una tendencia a la significación estadística con respecto a los CCR MSI-H, viéndose mayor expresión en este subtipo ($p = 0,052$). Sin embargo, también se han observado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de macrófagos redondeados y totales CD163+ ($p = 0,008$ y $p = 0,035$ respectivamente) en relación con el CCR MSI-H.
4. Con respecto a los datos histológicos de valor pronóstico (TNM, EED, PCT y TB) se han observado diferencias significativas entre la expresión macrófagos totales CD14+ y el TB, de manera que los casos de CCR con alta expresión de macrófagos CD14+ muestran nula o escasa expresión de TB en el frente invasor.

8. ANEXOS



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D^a Laly Gómez Sannicolás, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Sta. M^a del Rosell, Áreas II y VIII de Salud del Servicio Murciano de Salud

CERTIFICA QUE,

1º El CEI este CEI en reunión celebrada el 29/11/22 ha evaluado la propuesta del Promotor/investigador referida al estudio:

Tipo de estudio:

Cod. Protocolo	Nº EudraCT
No consta	No procede
Expresión IHQ de linfocitos CD8+ y macrófagos CD14 y CD163 en los diferentes subtipos histológicos de carcinoma colorrectal.	
Promotor:	no

Evaluando los aspectos del estudio requeridos por la legislación vigente:

- La realización del estudio en el Área II/VIII de salud es pertinente.
- El estudio cumple con los requisitos reglamentarios correspondientes al tipo de estudio.
- El diseño del estudio es adecuado para obtener las conclusiones objetivo del mismo.
- Los criterios de selección y retirada de los sujetos están indicados y son adecuados.
- Requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación a los objetivos del estudio y justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad de los investigadores y los medios disponibles apropiados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiera con el respeto a los postulados éticos.

En base a lo expuesto este comité emite el siguiente dictamen:

INFORME FAVORABLE

Investigador y Centros:
D^a Ana Moreno Méndez, Estudiante 6º Medicina

Lo que firmo en Cartagena, 30 de noviembre de 2022.

Fdo.: D^a Laly Gómez Sannicolás

1º Tras revisar y evaluar sujetos a las medidas de prevención ante la Covid-19, se decidió emitir el informe correspondiente al proyecto de Investigación anteriormente referido.

2º El CEI de las Áreas II y VIII tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95)

4º La composición actual del CEIC que ha evaluado la propuesta fue la siguiente:

Presidente:	D. A. Javier Trujillo Santos	Médico Adjunto Medicina Interna/Infecciosa.
Secretaria:	D ^a Laly Gómez Sannicolás,	Secretaria Unidad Investigación.
Vocales:	D. José M. Bueno Ortiz,	Médico Adjunto Centro de Salud de Fuente Álamo.
	D. Francisco Sánchez Rodríguez	Responsable Farmacia, adscrito a la GAP Área II.
	D. Blas García Rojo	Médico Adjunto Servicio Anestesiología y Reanimación.
	D. Federico Soria Arcos	Médico Adjunto Servicio Cardiología.
	D ^a M ^a Teresa Roldan Chicano	Enfermera Diplomada.
	D ^a Ruth L. Manrique Medina	Médico Adjunto Gerencia A. Primaria. Técnico de Salud
	D. Carlos F. Fernández Ferrer	Licenciado en Derecho
	D. Luis Escondrillas Gómez	Responsable Farmacia del HGUSL
	D. Manuel Jesús Cuenca Burgos	Médico adjunto Sº Pediatría, Vocal C. Bioética, Hospital
	D. Carlos F. Fernández Ferrez	HULAMM.
		Ldo. en Derecho.

*** En el caso de que se evaluara algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.**



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–249.
2. Castells Garangou A. Tumores del intestino. En: Borstnar CR, López FC. Farreras Rozman. *Medicina interna*. 19.^a ed. Borstnar CR, López FC. Barcelona: Elsevier; 2020. p. 180-189.
3. Nagtegaal ID, Arends MJ, Salto-Tellez M. Colorectal adenocarcinoma. En: Bosman FT. *WHO classification of tumors of the digestive system*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019. p. 177-187.
4. García Solano J, Pérez Guillermo M, Conesa Zamora P, Acosta Ortega J, Trujillo Santos J, Cerezuela Fuentes P, et al. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas; Further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. 2010;41(10):1359–68.
5. Lim S-B, Jeong S-Y, Lee MR, Ku-J-L, Shin Y-K, Kim WH, et al. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*. 2004;19(6):533-7.
6. Jiménez- Anula J, Luque RJ, Gaforio JJ, Delgado M. Valor pronóstico del patrón de invasión tumoral en el Cáncer Colorrectal Esporádico. *Cirugía Española*. 2005;77(6):377-42.
7. Parcepese P, Giordano G, Laudanna C, Febbraro A, Pancione M. Cancer-associated immune resistance and evasion of immune surveillance in colorectal cancer. *Gastroenterology Research and Practice*. 2016;2016:1–8.

8. Inagaki K, Kunisho S, Takigawa H, Yuge R, Oka S, Tanaka S, et al. Role of tumor-associated macrophages at the invasive front in human colorectal cancer progression. *Cancer Science*. 2021;112(7):2692–704.
9. Popēna I, Ābols A, Saulīte L, Pleiko K, Zandberga E, Jēkabsons K, et al. Effect of colorectal cancer-derived extracellular vesicles on the immunophenotype and cytokine secretion profile of monocytes and macrophages. *Cell Communication and Signaling*. 2018;16(1).
10. Baj-Krzyworzeka M, Mytar B, Szatanek R, Surmiak M, Węglarczyk K, Baran J, et al. Colorectal cancer-derived microvesicles modulate differentiation of human monocytes to macrophages. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14(1).
11. Yang C, Wei C, Wang S, Shi D, Zhang C, Lin X, et al. Elevated CD163+/cd68+ ratio at tumor invasive front is closely associated with aggressive phenotype and poor prognosis in colorectal cancer. *International Journal of Biological Sciences*. 2019;15(5):984–98.
12. Kinouchi M, Miura K, Mizoi T, Ishida K, Fujibuchi W, Ando T, Yazaki N, Saito K, Shiiba K, Sasaki I. Infiltration of CD14-positive macrophages at the invasive front indicates a favorable prognosis in colorectal cancer patients with lymph node metastasis. *Hepatogastroenterology*. 2011;58(106):352-358.
13. Ma S, Zhao Y, Liu X, Sun Zhang A, Zhang H, Hu G, et al. CD163 as a potential biomarker in colorectal cancer for tumor microenvironment and cancer prognosis: A Swedish study from tissue microarrays to big data analyses. *Cancers*. 2022;14(24):6166.
14. Yang C, Wei C, Wang S, Shi D, Zhang C, Lin X, et al. Elevated CD163+/cd68+ ratio at tumor invasive front is closely associated with aggressive

- phenotype and poor prognosis in colorectal cancer. *International Journal of Biological Sciences*. 2019;15(5):984–98.
15. Xue T, Yan K, Cai Y, Sun J, Chen Z, Chen X, et al. Prognostic significance of CD163+ tumor-associated macrophages in colorectal cancer. *World Journal of Surgical Oncology*. 2021;19(1).
 16. Ren Y, Chen Z, Sun J, Cai Y, Chen X, Wu W. The correlation between infiltration of foxp3+ Tregs, CD66B+ Tans and CD163+ Tams in Colorectal Cancer. *Central European Journal of Immunology*. 2022;47(1):1–7.
 17. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Methods. Mol Med* 2005; 114:257-68.
 18. Chen D, Wang H. The clinical and immune features of CD14 in colorectal cancer identified via large-scale analysis. *International Immunopharmacology*. 2020;88:106966.
 19. Lugli A, Zlobec I, Berger MD, Kirsch R, Nagtegaal ID. Tumour budding in solid cancers. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020;18(2):101–15.
 20. Trumpi K, Frenkel N, Peters T, Korthagen NM, Jongen JMJ, Raats D, et al. Macrophages induce “budding” in aggressive human colon cancer subtypes by protease-mediated disruption of tight junctions. *Oncotarget*. 2018;9(28):19490–507.

10. TABLAS

Tabla 1. Relación de la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 con las características clínicas: sexo, edad y localización tumoral.

CD14											
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (n=40)		FUSIFORMES			REDONDEADAS			TOTAL			
		NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	ESCALA n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	
SEXO	HOMBRE (n=25)	19 (76,0%)	6 (24,0%)	0,686	22 (88,0%)	3 (12,0%)	1,000	14 (56,0%)	11 (44,0%)	0,329	
	MUJER (n=15)	13 (86,7%)	2 (13,3%)		13 (86,7%)	2 (13,3%)		11 (73,3%)	4 (26,7%)		
EDAD	< 60 AÑOS (n=13)	10 (76,9%)	3 (23,1%)	1,000	12 (92,3%)	1 (7,7%)	1,000	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0,730	
	60 AÑOS O MAS (n=27)	22 (81,5%)	5 (18,5%)		23 (85,2%)	4 (14,8%)		16 (59,3%)	11 (40,7%)		
LOCALIZACION	COLON PROXIMAL (n=17)	14 (82,4%)	3 (17,6%)	1,000	13 (76,5%)	4 (23,5%)	0,144	10 (58,8%)	7 (41,2%)	0,680*	
	COLON DISTAL Y RECTO (n=23)	18 (78,3%)	5 (21,7%)		22 (95,7%)	1 (4,3%)		15 (65,2%)	8 (34,8%)		
CD163											
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (n=40)		FUSIFORMES			REDONDEADAS			TOTAL			
		NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	ESCALA n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	
SEXO	HOMBRE (n=25)	22 (88,0%)	3 (12,0%)	1,000	18 (72,0%)	7 (28,0%)	0,440	11 (44,0%)	14 (56,0%)	0,165*	
	MUJER (n=15)	13 (86,7%)	2 (13,3%)		13 (86,7%)	2 (13,3%)		10 (66,7%)	5 (33,3%)		
EDAD	< 60 AÑOS (n=13)	11 (84,6%)	2 (15,4%)	1,000	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0,690	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,906*	
	60 AÑOS O MAS (n=27)	24 (88,9%)	3 (11,1%)		20 (74,1%)	7 (25,9%)		14 (51,9%)	13 (48,1%)		
LOCALIZACION	COLON PROXIMAL (n=17)	15 (88,2%)	2 (11,8%)	1,000	11 (64,7%)	6 (35,3%)	0,134	8 (47,1%)	9 (52,9%)	0,554*	
	COLON DISTAL Y RECTO (n=23)	20 (87,0%)	3 (13,0%)		20 (87,0%)	3 (13,0%)		13 (56,5%)	10 (43,5%)		

(*): Valor p del test χ^2 (chi cuadrado) de Pearson.

Tabla 2. Relación de la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 con los subtipos histológicos de CCR: carcinoma convencional (CC), carcinoma serrado (CS) y carcinoma MSI-H.

CD14											
SUBTIPOS HISTOLÓGICOS (n=40)	FUSIFORMES			REDONDEADAS			TOTAL				
	NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	ESCALA n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P		
CC (n=28)	24 (85,7%)	4 (14,3%)		26 (92,9%)	2 (7,1%)		20 (71,4%)	8 (28,6%)			
CS (n=8)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	0,245	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0,052	4 (50,0%)	4 (50,0%)	0,122		
MSI-H (n=4)	3 (75,0%)	1 (25,0%)		2 (50,0%)	2 (50,0%)		1 (25,0%)	3 (75,0%)			
CD163											
SUBTIPOS HISTOLÓGICOS (n=40)	FUSIFORMES			REDONDEADAS			TOTAL				
	NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	ESCALA n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P		
CC (n=28)	24 (85,7%)	4 (14,3%)		25 (89,3%)	3 (10,7%)		18 (64,3%)	10 (35,7%)			
CS (n=8)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1,000	5 (62,5%)	3 (37,5%)	0,008	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,038		
MSI-H (n=4)	4 (100%)	0		1 (25,0%)	3 (75,0%)		0	4 (100%)			

Tabla 3. Relación de la expresión IHQ de macrófagos CD14 y CD163 con los datos histológicos de valor pronóstico; TNM, extensión extramural discontinua (EED), patrón de crecimiento tumoral (PCT) y *tumour budding* (TB).

CD 14											
DATOS HISTOLÓGICOS DE VALOR PRONÓSTICO (n=40)		FUSIFORMES			REDONDEADAS			TOTAL			
		NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	ESCALA n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	
TNM	TxN0 (n=13)	10 (76,9%)	3 (23,1%)	1,000	11 (84,6%)	2 (15,4%)	1,000	9 (69,2%)	16 (30,8%)	0,730	
	TxN+ (n=27)	22 (81,5%)	5 (18,5%)		24 (88,9%)	3 (11,1%)		4 (69,3%)	11 (40,7%)		
EED	(+) (n=17)	13 (76,5%)	4 (23,5%)	0,702	15 (88,2%)	2 (11,8%)	1,000	10 (58,8%)	7 (41,2%)	0,680*	
	(-) (n=23)	19 (82,6%)	4 (17,4%)		20 (87,0%)	3 (13,0%)		15 (65,2%)	8 (34,8%)		
PCT	INFILTRATIVO (n=29)	23 (79,3%)	6 (20,7%)	1,000	25 (86,2%)	4 (13,8%)	1,000	18 (62,1%)	11 (37,9%)	1,000	
	EXPANSIVO (n=11)	9 (81,8%)	2 (18,2%)		10 (90,9%)	1 (9,1%)		7 (63,6%)	4 (36,4%)		
TB	(+) (n=31)	26 (83,9%)	5 (16,1%)	0,348	28 (90,3%)	3 (9,7%)	0,311	23 (74,2%)	8 (25,8%)	0,008	
	(-) (n=9)	6 (66,7%)	3 (33,3%)		7 (77,8%)	2 (22,2%)		2 (22,2%)	7 (77,8%)		
CD163											
DATOS HISTOLÓGICOS DE VALOR PRONÓSTICO (n=40)		FUSIFORMES			REDONDEADAS			TOTAL			
		NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	NULA / LEVE n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	ESCALA n (%)	MODERADA / INTENSA n (%)	VALOR P	
TNM	TxN0 (n=13)	12 (92,3%)	1 (7,7%)	1,000	12 (92,3%)	1 (7,7%)	0,226	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0,186	
	TxN+ (n=27)	23 (85,2%)	4 (14,8%)		19 (70,4%)	8 (29,6%)		12 (44,4%)	15 (55,6%)		
EED	(+) (n=17)	14 (82,4%)	3 (17,6%)	0,634	12 (70,6%)	5 (29,4%)	0,456	7 (41,2%)	10 (58,8%)	0,218*	
	(-) (n=23)	21 (91,3%)	2 (8,7%)		19 (82,6%)	4 (17,4%)		14 (60,9%)	9 (39,1%)		
PCT	INFILTRATIVO (n=29)	24 (82,8%)	5 (17,2%)	0,298	22 (75,9%)	7 (24,1%)	1,000	14 (48,3%)	15 (51,7%)	0,488	
	EXPANSIVO (n=11)	11 (100%)	0		9 (81,8%)	2 (18,2%)		7 (63,6%)	4 (36,4%)		
TB	(+) (n=31)	27 (87,1%)	4 (12,9%)	1,000	25 (80,6%)	6 (19,4%)	0,394	17 (54,8%)	14 (45,2%)	0,712	
	(-) (n=9)	8 (88,9%)	1 (11,1%)		6 (66,7%)	3 (33,3%)		4 (44,4%)	5 (55,6%)		

(*): Valor p del test χ^2 (chi cuadrado) de Pearson.

11. FIGURAS

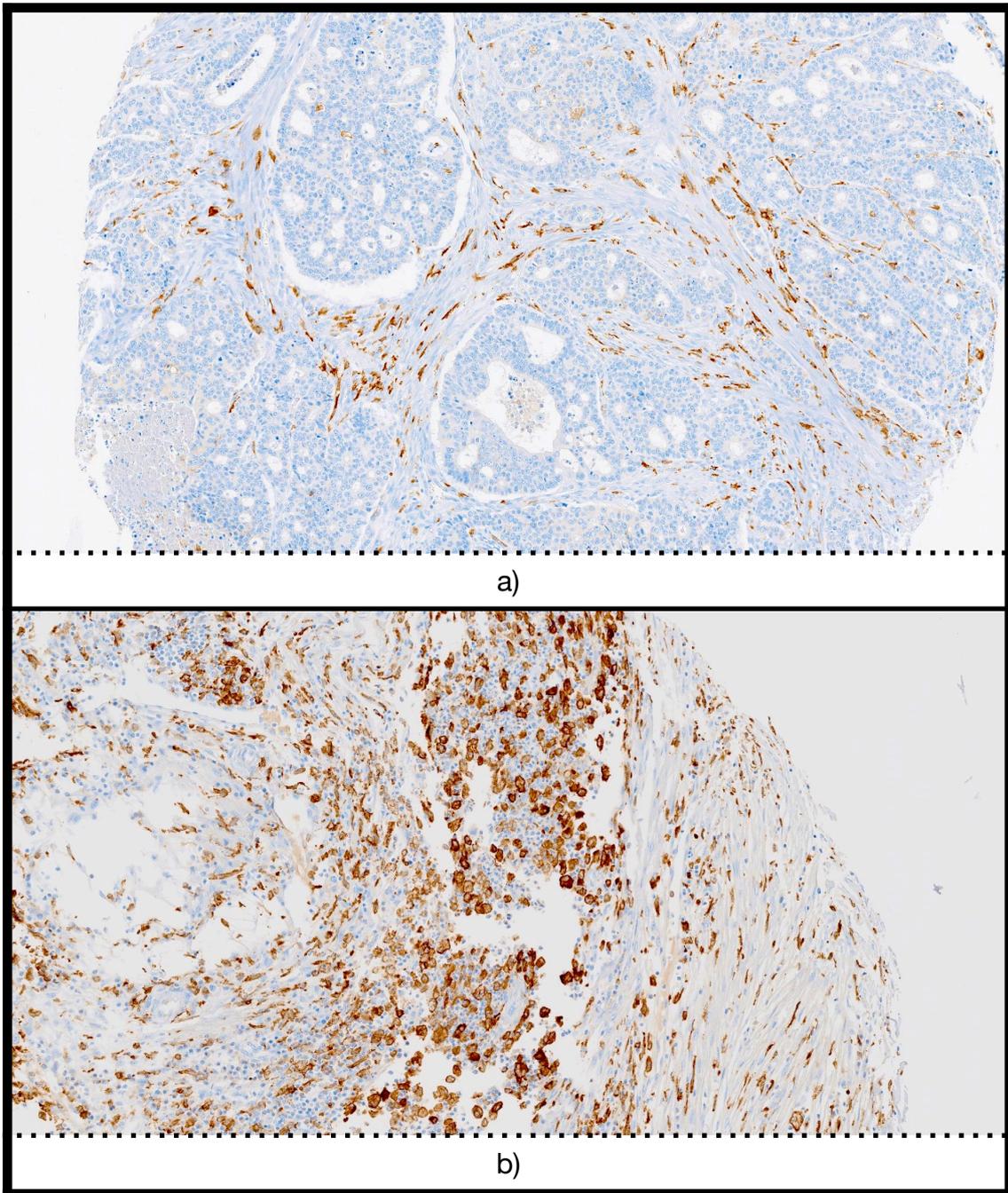


Figura 1: a) Expresión de CD14/163 en forma de macrófagos fusiformes-estrellados en el frente invasor de CCR. b) Expresión de CD14/163 en forma de macrófagos redondeados en el frente invasor de CCR.

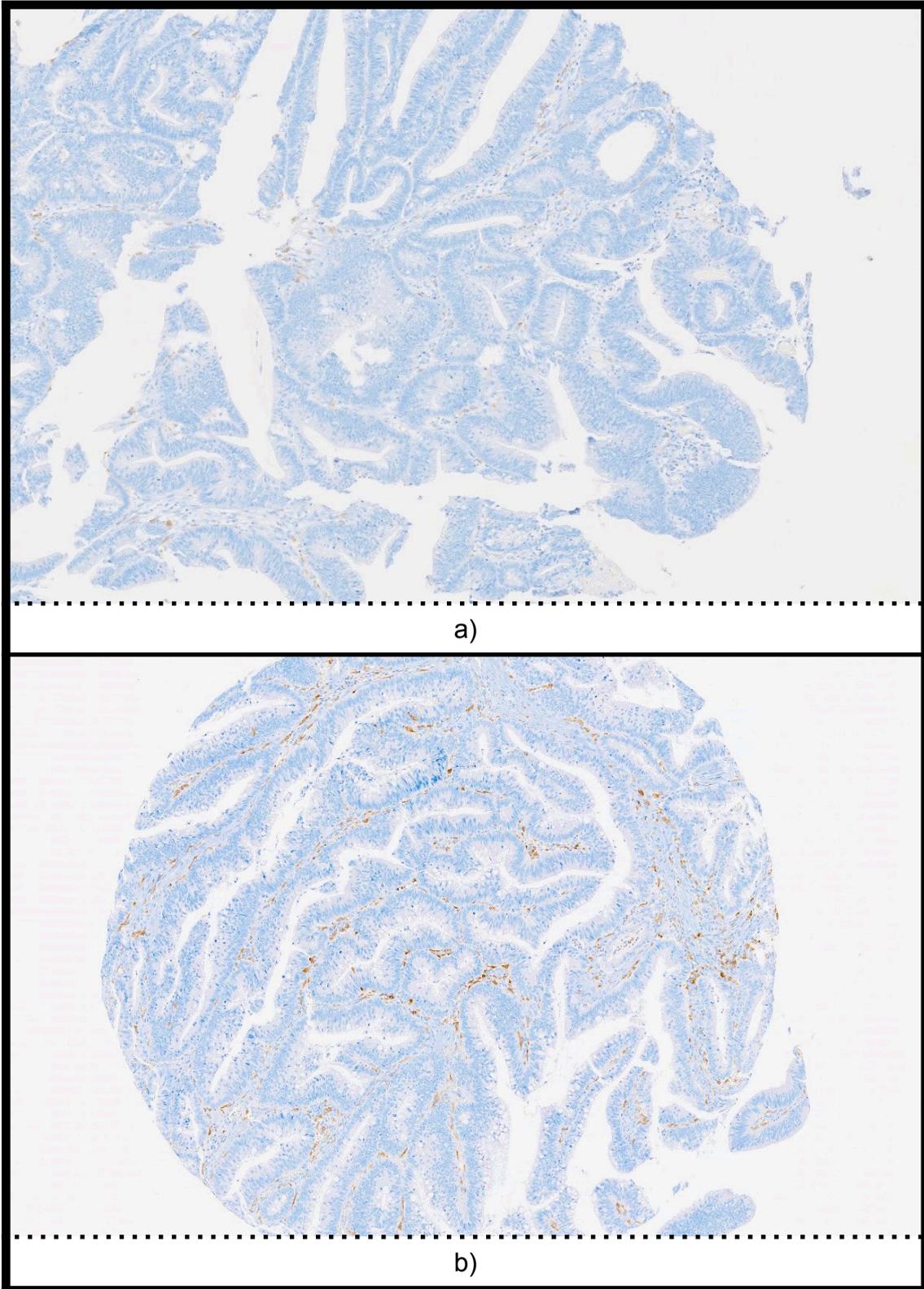


Figura 2.1: Expresión de macrófagos CD14/CD163 en el frente invasor de los CCR. a) No expresión. b) Expresión leve.

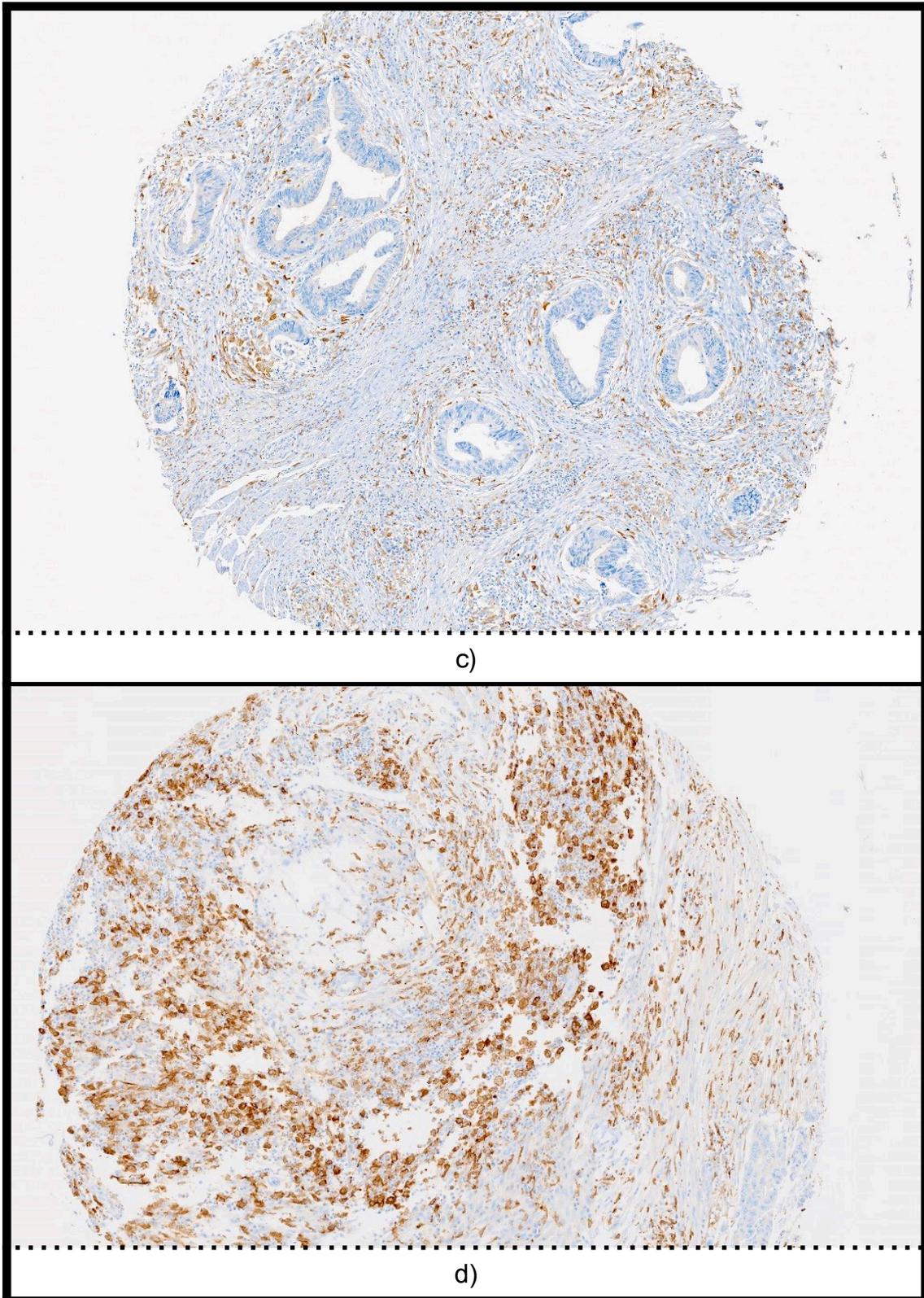


Figura 2.2: Expresión de macrófagos CD14/CD163 en el frente invasor de los CCR. c) Expresión moderada. d) Expresión intensa.

