

TRABAJO FIN DE GRADO



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

GRADO EN MEDICINA

TITULO:

“Expresión de proteínas relacionadas con la inhibición del
Checkpoint inmune en diferentes subtipos de Carcinoma
Colorrectal”

Autor: María Isabel García Rodríguez

Director: Dr. José García Solano

Murcia, 11 mayo de 2022

TRABAJO FIN DE GRADO



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

GRADO EN MEDICINA

TITULO:

“Expresión de proteínas relacionadas con la inhibición del
Checkpoint inmune en diferentes subtipos de Carcinoma
Colorrectal”

Autor: María Isabel García Rodríguez

Director: Dr. José García Solano

Murcia, 11 mayo de 2022

TRABAJO FIN DE GRADO



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

DEFENSA TRABAJO FIN DE GRADO

DATOS DEL ALUMNO	
Apellidos: García Rodríguez	Nombre: María Isabel
DNI: 23959077-T	Grado en Medicina
Facultad de Medicina	
Título del trabajo: "Expresión de proteínas relacionadas con la inhibición del Checkpoint inmune en diferentes subtipos de Carcinoma Colorrectal"	

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

En Murcia, a 11 de Mayo de 2022

Fdo.:

AGRADECIMIENTOS:

A mi familia, en especial a mis padres por el constante apoyo, esfuerzo y cariño a lo largo de este camino.

A mis compañeros por ser un apoyo fundamental, no hubiera sido lo mismo sin vosotros.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Santa Lucía por su colaboración y disposición, demostrando que la investigación es un pilar fundamental en su trabajo.

A mi director de este trabajo que es mucho más que eso, por ser mi ejemplo a seguir y la fuente de inspiración en mi vida. Gracias por todo lo que me enseñas cada día, por tu incansable esfuerzo, gracias por dejarme ser médico. Gracias a ti soy lo que soy, Papá.

ÍNDICE:

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	19
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	25
3.MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
4. RESULTADOS.....	31
5. DISCUSIÓN.....	33
6. AUTOCRÍTICA DEL TRABAJO.....	35
7. CONCLUSIONES.....	37
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39
9. TABLAS Y FIGURAS.....	43

GLOSARIO DE ABREVIATURAS:

CC: Subtipo no especificado
CCR: Carcinoma Colorrectal
CIMP: Fenotipo metilador de islas CpG
CIN: Inestabilidad cromosómica
CS: Adenocarcinomas serrados
CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DAB: 3,3'diamino-benzidina
EED: Extensión extramural discontinua
FOXP3: Factor de transcripción Forkhead box P3
IDO-1: Indoleamine-2,3-dioxygenase
IHQ: Inmunohistoquímica
ILPT: Infiltrado linfoide peritumoral
MATs: Macrófagos asociados al tumor
MSI: Inestabilidad de microsatélites
MSI-H: Inestabilidad de microsatélites alta
MSS: Estable para microsatélites
NK: Linfocitos natural killer
NOS: Subtipo no especificado
PCT: Patrón de crecimiento tumoral
POLD1: Dominio exonucleasa de la polimerasa Delta
POLE: Dominio exonucleasa de la polimerasa Epsilon
TILs: Infiltrado linfoide intratumoral
TMAs: Tissue Microarrayer
Treg: Linfocitos T reguladores

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La inmunidad celular del huésped es clave para el control de la mayoría de las neoplasias malignas. No obstante, estas neoplasias pueden evadir la respuesta inmune del huésped formando un microambiente tumoral inmunosupresivo. Entre otras moléculas, CTLA-4, FOXP3 e IDO-1 intervienen directamente en este entorno inmunosupresivo. El objetivo de este trabajo es observar qué tipo de expresión tienen estas moléculas en los tipos histológicos más frecuentes de CCR y su relación con parámetros clínicos e histológicos de valor pronóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se han confeccionado TMA's sobre un total de 55 casos de CCR del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Cartagena, para valorar la expresión inmunohistoquímica tisular de CTLA-4, FOXP3 e IDO-1 en los 3 subtipos histológicos más frecuentes de CCR. Se han comparado los resultados de expresión con datos clínicos y datos histopatológicos de valor pronóstico.

RESULTADOS: Se ha observado que la expresión de FOXP3 e IDO-1 están diferencialmente expresadas en los CCR MSI-H esporádicos y CS ($p=0,017$ y $0,036$ respectivamente). En los datos clínicos, solo hay diferencias en la expresión de IDO1 en relación con la localización distal-recto. En cuanto a los datos histopatológicos, hay diferente expresión de CTLA-4 e IDO-1 entre los CCR MSI-H ($p=0,032$) y los CCR MSS ($p=0,045$) respectivamente.

CONCLUSIÓN: El trabajo muestra cómo la expresión de IDO-1 es más frecuente en el CS y en los CCR de localización distal-recto, estables para microsatélites; y la expresión de FOXP3 es más frecuente en los CCR MSI-H esporádicos. La expresión de CTLA-4 está en relación con la inestabilidad de microsatélites. Estas tres biomoléculas se postulan como tres buenos marcadores predictivos en el tratamiento inmunoterápico de los paciente con CCR metastásico.

DESCRIPTORES: Checkpoint inmune, inmunidad antitumoral, Cáncer colorrectal, CTLA-4, FOXP3, IDO-1.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The host cellular immunity has a major significance in controlling most of malignant neoplasias. Even so, this malignant neoplasias are able to evade the host immune response by developing an immunosuppressive tumor microenvironment. Among other molecules, CTLA-4, FOXP3 and IDO-1 take an important part directly in this immunosuppressive environment. The goal of this paper is to observe what kind of expression display these molecules in every subtype of colorectal cancer and its connection with clinical and histological parameters with relevant prognostic value.

MATERIALS AND METHODS: We have developed TMAs of 55 patients with colorectal cancer from the Pathological Anatomy Service of Santa Lucia Hospital, in order to evaluate the tissue immunohistochemical expression of CTLA-4, FOXP3 and IDO-1 in every histological subtype of the most frequent colorectal cancer. We have compared this expression results with clinical and histopathological parameters with prognostic value.

RESULTS: This study shows that FOXP3 and IDO-1 expression is significantly increased in MSI-H sporadic and Serrated Adenocarcinoma ($p=0,017$ and $0,036$, respectively). Regarding the clinical parameters, we have only found differences in IDO-1 expression related with distal-rectum location. In relation with histopathological data, we have observed different CTLA-4 and IDO-1 expression in MSI-H ($p=0,032$) and MSS ($p=0,045$) colorectal cancer, respectively.

CONCLUSION: This study demonstrates how IDO-1 expression is increased in Serrated Adenocarcinoma and in distal-rectum colorectal cancer with microsatellite stability; and FOXP3 expression is increased in MSI-H sporadic tumors. Also, CTLA-4 has a strong relation with microsatellite instability. All this three biomolecules stand as good predictive indicators in immunotherapeutic treatment response in metastatic colorectal cancer patients.

KEY WORDS: Checkpoint immune, antitumoral immunity, colorrectal cancer, CTLA-4, FOXP3, IDO-1.

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más frecuentes. Es el tercer cáncer más diagnosticado y el segundo en términos de mortalidad¹. El CCR no es una enfermedad homogénea, si no que muestra cambios moleculares variables de unos a otros cánceres. En base a estos cambios moleculares, y según el mecanismo mayor de inestabilidad genética predominante en su génesis, se describen tres tipos de Cáncer Colorrectal: Adenocarcinoma NOS, CCR-MSI y CCR de tipo serrado². Los mecanismos mayores de inestabilidad genética son:

- 1- La inestabilidad cromosómica, que interviene en la producción del Adenocarcinoma NOS.
- 2- La inestabilidad de microsatélites, que da lugar al CCR-MSI.
- 3- El fenotipo metilador de islas CpG, que se relaciona con el CCR de tipo serrado.

1.- La inestabilidad cromosómica (CIN) es la forma más frecuente de inestabilidad genética en los CCR. Da lugar a los **Adenocarcinoma NOS**, que representan el 84% de los CCR esporádicos. En estos casos se producen cambios en el número de cromosomas, modificaciones en su estructura y reordenamientos cromosómicos. Estos cambios afectan principalmente al locus del gen APC y son detectables por la alta frecuencia de alteraciones en el número de copias somáticas de ADN. Son CCR con muy baja tasa de mutaciones (<8/Mb) y son estables para microsatélites (MSS)².

2.- La inestabilidad de microsatélites (MSI) está implicada en el 13-16% de los CCR esporádicos. Por medio de esta vía se observan, por una parte, CCR hipermutados debido a defectos en los genes reparadores de ADN: genes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*); y, por otra parte, CCR ultramutados por mutación en el dominio exonucleasa de la polimerasa Epsilon (POLE) o de la Delta (POLD1) del ADN. Suelen ser CCR sin inestabilidad cromosómica pero con inestabilidad de microsatélites elevada. A este subtipo se le denomina **CCR MSI-H**, ya sea de tipo **esporádico o hereditarios** (Síndrome de Lynch)².

3.- El fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) está muy relacionado con la segunda vía descrita de la inestabilidad de microsatélites. Es una vía epigenética que consiste en la capacidad de metilar genes supresores tumorales produciendo una hipermetilación de su promotor, lo que lleva al silenciamiento del gen. Esto se ve frecuentemente con el gen *MLH1* (genes MMR), produciendo un CCR con inestabilidad de microsatélites (MSI). La mayoría de **CCR de tipo Serrado** suelen originarse por esta vía².

A pesar de las mejoras en el tratamiento oncológico en las últimas décadas, el paciente con CCR metastásico sigue teniendo un pronóstico desfavorable con una supervivencia media de 30 meses³. Por tanto, se están buscando nuevas estrategias terapéuticas en este tipo de pacientes que sean más efectivas y mejoren su supervivencia. En este sentido, desde hace pocos años, se están desarrollando acciones terapéuticas en relación con el sistema inmune antitumoral con el objetivo de aumentar la esperanza de vida de estos pacientes⁴.

Puntos de control inmunitarios (“Checkpoint inmune”):

La inmunidad celular es un arma fundamental para el control de la mayoría de las neoplasias malignas. No obstante, estas neoplasias malignas pueden evadir la respuesta inmune del huésped formando un microambiente tumoral inmunosupresivo, siendo un ejemplo de esto el melanoma. Este microambiente inmunosupresivo desarrollado por el cáncer ha sido sujeto de numerosos estudios con el resultado de nuevas terapias inmunes que nos sirven para tratar pacientes en estadios metastásicos⁵.

Los puntos de control inmunitarios, “checkpoint inmunes”, forman parte de la respuesta normal del sistema inmunitario y su papel es regular la respuesta inmune impidiendo que esta sea excesiva.

Ante un proceso neoplásico, cuando los linfocitos T interactúan con el antígeno tumoral ocurren diferentes procesos que regulan la respuesta del sistema inmunitario frente a este tumor. La finalidad de estos puntos de control inmunitarios, o “checkpoint inmune”, es encontrar un equilibrio entre las señales activadoras e inhibitorias, de modo que se obtenga una respuesta óptima y suficientemente activa como para ser funcional pero controlada, mediante vías

inhibitorias, para evitar daños autoinmunes. Así pues, para generar una reacción inmune completa se requieren moléculas coactivadoras y coinhibidoras que regulen la respuesta. Las células tumorales tienen la capacidad escapar de la respuesta inmunitaria interfiriendo en este proceso de coestimulación/coinhibición, activando las vías inhibitorias de las células T de forma directa o indirecta mediante la secreción de IL-10, IL-4 o TFG- β , es decir, actuando sobre esos puntos de control inmunitarios⁶.

Microambiente tumoral con evasión inmune:

El tumor desarrolla una serie de estrategias que generan un microambiente tumoral con el objetivo de evadir la respuesta inmune del huésped. Ejemplos de esto son las citocinas anti-inflamatorias como IL-10, defectos en la presentación de antígenos tumorales, la expresión de moléculas inmunes tales como PD-L1 y CTLA4, los linfocitos T reguladores (Treg), los macrófagos asociados al tumor (MATs) o las células que expresan enzimas que catabolizan aminoácidos como la indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)⁶. La composición de linfocitos intratumorales dentro del microambiente tumoral determina si el fenotipo es de inmunidad anti-tumoral o de evasión inmune. La inmunidad anti-tumoral está caracterizada por linfocitos T CD8+ y macrófagos M1, mientras que la evasión inmune se caracteriza por mastocitos, Tregs, macrófagos M2 y otras células inmunosupresivas⁷.

El estudio de estas células, receptores y moléculas en los distintos tipos de cánceres, y cómo se expresan en cada uno de ellos, son de vital importancia a la hora de utilizar terapias relacionadas con la supresión inmune en los tumores. Un ejemplo son los recientes fármacos que bloquean a los inhibidores del “checkpoint inmune”, como son los anticuerpos monoclonales anti-CTLA4 y anti-PD-L1 que están teniendo muy buena respuesta en los pacientes con distintos tipos de cánceres metastásicos⁴.

En el caso del CCR, la progresión tumoral se ha asociado con una supresión de la inmunidad celular del huésped. Se ha observado cómo el CCR, ejerce un efecto supresor directo sobre la inmunidad mediada por células del huésped y su vuelta a la normalidad inmune una vez que el CCR se ha resecado⁸.

Los linfocitos Treg y sus biomoléculas relacionadas con el silenciamiento inmune anti-tumoral:

Los Treg son una subpoblación de linfocitos T CD4+ que expresan el factor de transcripción Forkhead box P3 (FOXP3), que es su marcador más específico (Figura 1). Estos linfocitos T mantienen la auto-tolerancia inmune y juegan un papel crucial en la prevención de la respuesta autoinmune en pacientes sanos. En el cáncer, los Treg silencian el efecto inmunitario que crean los antígenos de las células tumorales y, por tanto, pueden tener un efecto de promoción del crecimiento tumoral. Estos Treg pueden suprimir los efectos de los linfocitos T contra el tumor mediante la secreción de IL-10, TFG-beta y la expresión de moléculas como CTLA4, creando un microambiente inmunosupresivo⁹.

FOXP3 actúa principalmente en la regulación del desarrollo y función de los Treg CD4 + CD25 +¹⁰. Algunos estudios confirman que una elevada expresión de FOXP3 en los Treg permite a las células tumorales escapar del control inmune y, por tanto, permite la proliferación neoplásica. Estudios previos indican que la expresión de FOXP3 en los Treg es un factor pronóstico en los CCR^{11,12}. Una alta densidad de Treg FOXP3+ se ha asociado con mal pronóstico en varios tumores sólidos del tracto digestivo como en el carcinoma de páncreas y el hepatocarcinoma^{13,14}. Se ha observado que las células tumorales pueden expresar directamente FOXP3, proporcionándoles un poder inmunosupresivo directo¹⁵ y esto contribuye a la progresión del CCR¹⁶. Sin embargo, en trabajos como el de Xiuwei Sun et al y el de Ganapathi et al, observan que una alta expresión de FOXP3 en las células tumorales del CCR se relaciona con un mejor pronóstico^{17,18}. Por tanto, la expresión, función o señalización de FOXP3 puede ser de gran importancia como diana terapéutica.

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) es un enzima citosólico que cataliza el metabolismo del triptófano para convertirlo en kynurenine (Figura 2). IDO parece ser un importante regulador de la actividad de los Treg. La depleción de triptófano es un proceso inmunomodulador ya que inhibe la proliferación de las células T efectoras antitumorales y activa su apoptosis. El aumento de kynurenine y sus metabolitos activa la diferenciación de los Treg^{19,20}. Además de la inhibición de las células T efectoras y la activación de

los Treg, IDO tiene un efecto inmunosupresivo sobre los linfocitos natural killer (NK) y un efecto activador de células dendríticas y células mieloides inmunosupresivas²¹. Conforme va aumentando la expresión de IDO en el microambiente tumoral (en macrófagos, células dendríticas, mastocitos...), incluso en las células neoplásicas de ciertos cánceres como el CCR, va produciéndose mayor efecto inmunosupresor y aumento de la progresión tumoral²².

CTLA-4, acrónimo del inglés Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, es un receptor proteico situado en la membrana celular de los linfocitos T (Figura 3). Cuando CTLA-4 se une a la proteína B7, impide que las células T destruyan a células diana como las tumorales. Los Tregs pueden inhibir la activación de los linfocitos LTCD8+ a través de CTLA4, produciendo inmunosupresión tumoral²³. Hoy día, disponemos de fármacos que pueden bloquear el checkpoint inmune tal como Tremelimumab, que es inhibidor de CTLA4, y que han demostrado prolongar significativamente la supervivencia global en un amplio rango de cánceres²⁴. A pesar de todos estos progresos, solo una fracción de pacientes con tumores sólidos se benefician del tratamiento anti-CTLA4²⁵.

Por todo lo anterior, creemos que el estudio de estas biomoléculas relacionadas con el ambiente de supresión inmune anti-tumoral, su expresión o no en el CCR y en los distintos subtipos histológicos del mismo, pueden contribuir a la selección de pacientes candidatos al tratamiento con terapias relacionadas con el “checkpoint inmune”.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO PRINCIPAL:

1.- Observar si hay expresión de CTLA-4, FOXP3 e IDO1 en el CCR y comparar si esta expresión inmunohistoquímica (IHQ) es diferente en los tres subtipos histopatológicos más frecuentes de CCR (adenocarcinoma NOS, adenocarcinoma serrado y carcinoma MSI-H esporádico).

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

2.- Observar si la expresión de CTLA-4, FOXP3 e IDO1 está en relación con datos clínicos como edad, sexo y localización del CCR.

3.- Observar si la expresión de CTLA-4, FOXP3 e IDO1 está en relación con datos histopatológicos de valor pronóstico del CCR como el TNM, el patrón de crecimiento tumoral, la gemación tumoral, la invasión vascular, linfática y perineural, extensión extramural discontinua, el infiltrado linfoide peri- e intratumoral y la inestabilidad de microsatélites.

3. MATERIAL Y MÉTODOS:

En este trabajo se ha realizado un estudio analítico retrospectivo de corte transversal.

Selección de pacientes y de material de estudio

Las muestras utilizadas en este estudio se han obtenido del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena. Utilizando la base de datos de dicho servicio (Pathwin), se han estudiado de manera retrospectiva los CCR intervenidos quirúrgicamente en dicho Hospital entre los años 2016 y 2018 (periodo de 3 años) que son un total 360 CCR. Estas muestras van a ser objeto de estudio en relación con una tesis doctoral, por lo que los casos seleccionados en este trabajo corresponden al inicio de dicha tesis doctoral. En total se ha iniciado el estudio con los 55 primeros pacientes del listado de 360 CCR, tomados consecutivamente. De estos 55 CCR, 33 corresponden a adenocarcinomas de tipo NOS, 15 son adenocarcinomas serrados (CS) y 7 son MSI-H esporádicos (MSI-H).

De los informes de Anatomía Patológica se han seleccionado los datos clínicos de edad, sexo y localización del CCR y los datos histopatológicos de valor pronóstico como el TNM, patrón de crecimiento tumoral (expansivo/infiltrativo), gemación tumoral (bajo grado: <5 grupos, alto grado: >5 grupos), existencia o no de invasión linfática, vascular o perineural, existencia o no de extensión extramural discontinua (nidios neoplásicos en grasa periintestinal que no están en relación con ganglios linfáticos), intensidad de infiltrado linfoide peri e intratumoral (escaso ó nulo/moderado-intenso) y la existencia o no de inestabilidad de microsatélites (MSS/MSI-H). Todos estos datos clínicos y anatomopatológicos de valor pronóstico se resumen en la tabla 1.

Confección de TMAs:

De estos 55 CCR, se han seleccionado del total de las preparaciones histológicas de cada caso, una preparación modelo donde se observaba bien el frente invasor. Se marca un círculo en el cristal en la zona representativa de dicha muestra para posteriormente escoger dicha 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 estándar²⁶ (Figura 4).

Estudio IHQ de CTLA-4, FOXP3 e IDO-1 y su valoración:

Posteriormente se realizaron cortes de 4 µm de cada TMA para realizar la tinción inmunohistoquímica con cada una de las proteínas a estudiar. Las proteínas son:

- CTLA4 Polyclonal Antibody, IgG Rabbit de ThermoFisher Scientific.
- Anti-FOXP3 mouse monoclonal (236A/E7) de ABCAM.
- Anti-IDO-1, clon 4B7, mouse monoclonal de Sigms-Aldrich.

Este procedimiento se llevó a cabo 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-CTLA4, anti-FOXP3 y anti-IDO-1. 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 tres proteínas, fueron valoradas por un patólogo experto en patología digestiva (JGS) y por la autora del trabajo.

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 en cuatro grupos (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 estudio, se consideraron positivas aquellas muestras que tenían una positividad superior al 5% (letras B,C ó D) y una intensidad moderada o intensa (letras C ó D). 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 o nula los números $< o = a 1$. Las expresiones >1 se han considerado positivas. Solo se ha valorado la expresión IHQ en el estroma tumoral. En la figura 5 se muestran los casos típicos positivos y negativos de cada TMA.

Una vez obtenidos los resultados de expresión IHQ de las tres proteínas descritas, se han relacionado con los distintos subtipos histopatológicos de CCR (tabla 2), con los datos clínicos (tabla 3) y con los datos histopatológicos de valor pronóstico (tabla 4).

Análisis estadístico

Las características clinicopatológicas de los pacientes se representaron como mediana junto con el rango intercuartil (IQR) o como frecuencias y porcentajes para las variables continuas y categóricas, respectivamente. La asociación de las variables biológicas y las características clínicas y anatomopatológicas se analizó por estadística inferencial no paramétrica debido al pequeño tamaño muestral. El análisis estadístico se realizó con el software IBM SPSS 21.0.

4. **RESULTADOS**

En la tabla 1 se detallan los datos clínicos, histopatológicos y los subtipos de CCR de los 55 pacientes seleccionados.

Relación expresión IHQ con subtipos histológicos de CCR:

Los resultados de la expresión IHQ de las tres proteínas descritas se han relacionado con los subtipos histológicos de CCR (tabla 2). No se ha observado diferencias de expresión de CTLA4 en los tres subtipos de CCR ($p=0,17$). Sí se ha observado diferente expresión de FOXP3 e IDO-1 en dos subtipos histológicos de CCR; observándose más expresión de FOXP3 en los CCR MSI-H esporádicos ($p=0,017$) así como de IDO-1 en los CS ($p=0,036$).

Relación expresión IHQ con los datos clínicos:

Los resultados del estudio IHQ de los 55 pacientes se han relacionado con los datos clínicos (tabla 3). No se han observado diferencias de expresión de las tres proteínas en relación con edad y sexo de los pacientes ($p>0,05$). En relación con la localización, la expresión de IDO-1 ha mostrado diferencias significativas ($p=0,026$), observándose más expresión de IDO-1 en los CCR de localización distal-recto que en los proximales, no observándose estas diferencias en la expresión de FOXP3 ni CTLA4 ($p>0,05$).

Relación expresión IHQ con los datos histopatológicos de valor pronóstico:

La expresión IHQ con los datos histopatológicos de valor pronóstico se describen en la tabla 4. No se han observado diferencias significativas en la expresión de las tres proteínas frente al TNM, PCT, gemación tumoral, invasión linfática, venosa, perineural o EED ($p>0,05$). Respecto a la expresión de IDO-1 se ha observado indicios de relación estadística en el TILs ($p=0,05$) y en el ILPT ($p=0,06$), observándose más expresión de IDO-1 en los casos de CCR con escaso o nulo infiltrado linfoide relacionado con el tumor. No se ha observado esta relación con el resto de proteínas. La expresión de CTLA4 e IDO-1 ha mostrado relación estadística con la existencia o no de inestabilidad

de microsatélites (MSS/MSI) ($p=0,032$ y $p=0,045$ respectivamente), observándose que la expresión de CTLA4 es más intensa en los CCR con inestabilidad de microsatélites y la expresión de IDO-1 se relaciona más con los CCR MSS.

5. **DISCUSIÓN**

El estudio del microambiente tumoral en el frente invasor de un tumor y su relación con el sistema inmune es un parámetro fundamental para predecir el comportamiento y agresividad de dicho tumor. En el CCR ya se demostró cómo la intensa respuesta inmune, y especialmente el alto número de linfocitos intratumorales (TILs), se asociaba con un buen pronóstico²⁷.

No obstante, el tumor puede suavizar o inhibir esta respuesta inmune sintetizando biomoléculas que generan un microambiente tumoral inmunosupresivo. Entre las biomoléculas relacionadas con este microambiente inmunosupresivo encontramos: CTLA-4, FOXP3 e IDO-1, que son las estudiadas en este trabajo.

El estudio de la expresión de estas proteínas en los CCR con la perspectiva de seleccionar los candidatos ideales para tratamiento con bloqueadores de estas proteínas (bloqueadores del “checkpoint inmune”) es fundamental para que estos tratamientos sean lo más efectivos posible y que no se utilicen en pacientes innecesariamente para no desperdiciar recursos económicos y para no producir al paciente efectos adversos sin necesidad.

No hay muchos trabajos que valoren la expresión de estas proteínas en los CCR^{17,28,29,30} y sus resultados son semejantes a los observados en nuestro trabajo. No obstante, no hemos encontrado ningún trabajo que valore su expresión en los distintos subtipos histológicos de CCR y su relación con datos clínicos ni histopatológicos.

La expresión IHQ de estas proteínas en los subtipos de CCR se resume en la tabla 2. Se observa cómo hay expresión diferente de FOXP3 y de IDO-1, evidenciándose expresión más intensa de FOXP3 en los subtipos CCR MSI-H frente a los dos subtipos restantes, y lo contrario con la proteína IDO-1 que se expresan más intensamente en los CS y no suele tener expresión en los CCR MSI-H.

Estos hallazgos son contrarios a lo que observa Meireson A et al en su trabajo²⁸, en el que observa que la expresión de IDO-1 es más intensa en los CCR MSI-H. Si embargo, en el trabajo de Ma WJ et al³⁰, observan cómo la expresión de IDO-1 tampoco está asociada a la infiltración de linfocitos en el

tumor. Este trabajo sí concuerda con nuestros resultados, en los que observamos en la tabla 4 cómo la expresión de IDO-1 muestra indicios de significación y cómo se relaciona con los CCR que muestran muy escaso o nulo infiltrado linfoide peri- o intratumoral. Además en el trabajo previo de García Solano et al muestran cómo los CS presentan menos respuesta linfoide peritumoral que el resto de CCR NOS y MSI-H³¹.

Esta expresión diferencial de IDO-1 en los CS frente a los demás subtipos de CCR es un hallazgo no descrito en la literatura hasta el momento y creemos que puede ser de gran importancia. Esto es concordante con varios trabajos realizados hasta la fecha, en los que se pone de manifiesto como la estimulación de la vía de señalización TGF-beta desencadena la vía de señalización IDO-1³², y que la vía de señalización TGF-beta es una de las vías predominantes en la carcinogénesis del CS. También se sabe que es una vía relacionada con mal pronóstico en los CCR, así como una de las vías moleculares que menos opciones terapéuticas tiene actualmente³³. Además, la expresión de IDO-1 es significativamente mayor en los CCR MSS frente a los MSI-H y esto está relacionado con lo comentado hasta ahora respecto a que los CCR originados por la vía TGF-beta son CCR en su mayor parte MSS con escasa infiltración linfoide peritumoral con acción antitumoral³³. Por tanto, los pacientes con CS podrían beneficiarse de los futuros tratamientos anti-IDO-1 frente a los demás subtipos de CCR.

Sin embargo, la mayor expresión de CTLA-4 y FOXP3 en los CCR MSI-H que en los MSS hace que estos tipos de CCR sean más susceptibles de tratamiento con bloqueadores de estas proteínas. Estos hallazgos nos orientan a que el posible tratamiento inmunoterápico bloqueando IDO-1 sería más efectivo en los CCR distales-recto estables para microsatélites, mientras que los CCR proximales, que suelen ser MSI-H, responderían posiblemente mejor a tratamiento inmune con bloqueadores de CTLA-4 y FOXP3.

6. AUTOCRÍTICA DEL TRABAJO

El trabajo actual es un preliminar de un trabajo mayor con más número de casos de CCR, con lo que los datos obtenidos hay que valorarlos con cautela puesto que el número de pacientes no es muy alto. No obstante, aun con un número de pacientes bajo, el trabajo muestra datos estadísticamente significativos que orienta a que en el trabajo final se podrían obtener datos muy relevantes.

La expresión diferencial de IDO-1 en los CS frente a los demás subtipos de CCR es un dato que no está publicado hasta ahora en la literatura. Su relación con la vía TGF-beta y con los CCR MSS es un gran hallazgo que podría explicar el déficit de inmunidad tumoral en los CCR de este subgrupo 4 de la clasificación molecular de los CCR, dominado por la vía TGF-beta y MSS, y que podrían beneficiarse de esta diana molecular para aumentar la inmunidad anti-tumoral en este subgrupo de CCR tan agresivo y de peor pronóstico.

Los datos obtenidos en la Tesis doctoral que completará este trabajo, serán publicados en revista internacional JCR e incluirán entre sus autores a la autora de este TFG.

7. CONCLUSIONES

1.- Se ha observado expresión IHQ de CTLA-4, FOXP3 e IDO-1 en los CCR. Se observa aumento de la expresión de FOXP3 ($p=0,017$) en los CCR MSI-H y de IDO-1 ($p=0,036$) en los CS, no observándose estas diferencias en la expresión de CTLA-4 ($p>0,05$).

2.- De las tres proteínas estudiadas, solo IDO-1 muestra diferente expresión en relación con la localización del tumor ($p=0,026$), expresándose más intensamente en los CCR de localización distal-recto. No se ha observado diferencias de expresión de las tres proteínas en relación con la edad ni el sexo. Tampoco se ha observado diferencias de expresión de CTLA-4 ni FOXP3 en relación con la localización.

3.- En relación con los datos histopatológicos de valor pronóstico, se observa que la expresión de IDO-1 muestra expresión diferente en relación con la inestabilidad de microsatélites en el CCR, observándose que se expresa más intensamente en los CCR que son MSS ($p=0,045$), mientras que CTLA-4, se observa con más intensidad en los CCR MSI-H ($p=0,032$).

8. **BIBLIOGRAFÍA**

1- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424.

2- S. R. Hamilton, F.T. Bosman, P. Boffetta, M. et al. WHO classification of tumours of the digestive system, Ed. By F.T Bosman, F. Carneiro, H.R. Hruban, N.D. Theise (IARC Press, Lyon, 2019), p. 134.

3- Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016;27:1386–422.

4- Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair–deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:773–9.

5- Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, et al. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*. 2017;8(62):106132–42.

6- Fourcade J, Zarour HM. Strategies to reverse melanoma-induced T-cell dysfunction. *Clin Dermatol*. 2013;31(3):251–6.

7- Cervantes-Villagrana RD, Albores-Garcia D, Cervantes-Villagrana AR, Garcia-Acevez SJ. Tumor-induced neurogenesis and immune evasion as targets of innovative anti-cancer therapies. *Signal Transd Target Ther*. 2020;5(1):99.

8- Galizia G, Lieto E, De Vita F, et al. Circulating levels of interleukin-10 and interleukin-6 in gastric and colon cancer patients before and after surgery: relationship with radicality and outcome. *J Interferon Cytokine Res* 2002. 22:

473–482.

9- Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016;28(8):401–9.

10- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity* 2005. 22:329–341.

11- Liu Z, Huang Q, Liu G, et al. Presence of FOXP3(+) Treg cells is correlated with colorectal cancer progression. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2014. 7: 1781–1785.

12- Frey DM, Droeser RA, Viehl CT, et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair proficient colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* 2010. 126: 2635–2643.

13- Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, et al. Prevalence of FOXP3. regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 2006;12: 5423–5434.

14-Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, et al. FOXP3. regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2007.13: 902–911.

15- Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S. et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res* 2008. 68: 3001–3009.

16- Kim M, Grimmig T, Grimm M, et al. Expression of Foxp3 in colorectal cancer but not in Treg cells correlates with disease progression in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2013. 8: e53630.

17- Sun X, Feng Z, Wang Y et al. Expression of Foxp3 and its prognostic significance in colorectal cancer. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2017, Vol. 30(2) 201–206.

18- Ganapathi SK, Beggs AD, Hodgson SV, Kumar D Expression and DNA methylation of TNF, IFNG and FOXP3 in colorectal cancer and their prognostic significance. *British Journal of Cancer* (2014) 111, 1581–1589.

19- Brochez L, Chevolet I, Kruse V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2017;76:167–82

20- Fallarino F, Grohmann U. Using an ancient tool for igniting and propagating immune tolerance: IDO as an inducer and amplifier of regulatory T cell functions. *Curr Med Chem*. 2011;18(15):2215–21.

21- Hornyák L, Dobos N, Koncz G, et al. The role of Indoleamine-2,3-dioxygenase in Cancer development, diagnostics, and therapy. *Front Immunol*. 2018;9:151.

22- Löb S, Königsrainer A, Zieker D, et al. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:153–7.

23- Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):275–87.

24- Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;379(24):2342–50.

25- Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational

landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348:124–128.

26-Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Methods. Mol Med* 2005; 114:257-68).

27- Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*. 2016; 44:698– 711.

28-Meireson A, Chevolet I, Hulstaert E, et al. Peritumoral endothelial indoleamine 2, 3-dioxygenase expression is an early independent marker of disease relapse in colorectal cancer and is influenced by DNA mismatch repair profile. *Oncotarget*, 2018;9(38):25216-25224.

29-Ciardiello D, Vitiello PP, Cardone C et al. Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy *Cancer Treatment Reviews* 2019;76:22-32.

30-Ma W-J, Wang X, Yan W-T et al. Indoleamine-2,3-dioxygenase 1/ cyclooxygenase 2 expression prediction for adverse prognosis in colorectal *Cáncer World J Gastroenterol* 2018 May 28; 24(20): 2181-2190.

31- García-Solano, J. Et al Clinicopathologic Study of 85 Colorectal Serrated Adenocarcinomas: Further Insights into the Full Recognition of a New Subset of Colorectal Carcinoma. *Hum. Pathol.* 2010, 41, 1359–1368.

32-Iacono A, Pompa A, de Marchis F, et al. Class IA Pi3Ks regulate subcellular and functional dynamics of IDO1. *EMBO reports*. 2020;21: e49756.

33- Nakanishi Y, Diaz-Meco MT, Jorge Moscat J. Serrated Colorectal Cancer: The Road Less Travelled? *Trends Cancer*. 2019; 5(11): 742-754.

9. TABLAS Y FIGURAS

9.1. Tablas.

Tabla 1. Número de casos de cada uno de los parámetros clínicos e histopatológicos.

	Nº Casos	%
SEXO		
VARÓN	29	55,73
MUJER	26	47,27
EDAD		
<ó =65	17	30,9
>65	38	69,1
LOCALIZACIÓN		
C.PROXIMAL	26	47,27
C.DISTAL	15	27,27
RECTO	14	25,46
SUBTIPO HISTOLÓGICO		
ADENOCA NOS	33	60
CS	15	27,27
CCR MSI-H	7	12,73
TNM		
Intramural (pTis, T1, T2)	13	23,64
Extramural (pT3, T4)	42	76,36
NO	28	50,9
N+	27	49,1
PCT		
EXPANSIVO	28	50,9
INFILTRATIVO	27	49,1
TUMOR BUDDING		
BAJO GRADO	47	85,5
ALTO GRADO	8	14,5
INVASIÓN LINFÁTICA		
NO	35	63,64
SI	20	36,36
INVASIÓN VASCULAR		
NO	48	87,27
SI	7	12,73
INVASIÓN PERINEURAL		
NO	40	72,73
SI	15	27,27
EED		
NO	45	81,82
SI	10	18,18

	Nº casos	%
ILPT		
NO Ó LEVE	36	65,45
MODERADO-INTENSO	19	34,55
ILIT (TILs)		
NO Ó LEVE	44	80
MODERADO-INTENSO	11	20
IMS		
MSS	45	81,82
MSI-H	10	18,18

Tabla 2. Relación en la expresión de CTLA-4, FOXP3 e IDO-1 con los subtipos histológicos de los CCR. p: prueba de chi-cuadrado de Pearson.

N=55 CASOS	Casos %	CTLA-4		p	FOXP3		p	IDO1		p	
		<=1 n=33	>1 n=22		<=1 n=39	>1n=16		<1 n=41	>1 n=14		
SUBTIPO HISTOLÓGICO											
ADENOCA NOS	n=33	60	22	11(32%)	0,174	27	6(17,6%)	0,017	26	7(20,6%)	0,036
CS	n=15	27,2	9	6(42,9%)		10	5(35,7%)		7	7(50%)	
CCR MSI-H	n=7	12,7	2	5(71,4%)		2	5(71,4%)		7	0 (0%)	
Total:	n=55										

Tabla 3. Relación en la expresión de CTLA-4, FOXP3 e IDO-1 con datos clínicos de los pacientes.

N=55 CASOS	Casos %	CTLA-4		p	FOXP3		p	IDO1		p	
		<=1 n=33	>1 n=22		<=1 n=39	>1n=16		<1 n=41	>1 n=14		
SEXO											
VARÓN	29	52,73	18	11	0,741	21	8	0,86	20	9	0,211
MUJER	26	47,27	15	11		18	8		21	5	
EDAD											
<6 =65	17	30,9	11	6	0,634	12	5	0,537	12	5	0,507
>65	38	69,1	22	16		27	11		29	9	
LOCALIZACIÓN											
C.PROXIMAL	26	47,27	12	14	0,096	18	8	0,933	23	3	0,026
C.DISTAL	15	27,27	12	3		11	4		11	4	
RECTO	14	25,46	9	5		10	4		7	7	

Tabla 4. Relación en la expresión de CTLA4, FOXP3 e IDO1 con datos histopatológicos de valor pronóstico de los CCR .

N=55 CASOS	Casos	%	CTLA-4			FOXP3			IDO1		
			<=1 n=3	>1 n=22	p	<=1 n=3	>1 n=16	p	<1 n=41	>1 n=14	p
TNM											
Intramural (pTis, T1, T2)	13	23,64	6	7	0,271	9	4	0,584	10	3	0,977
Extramural (pT3, T4)	42	76,36	27	15		30	12		31	11	
NO	28	50,9	15	13	0,322	21	7	0,551	20	8	0,427
N+	27	49,1	18	9		18	9		21	6	
PCT											
EXPANSIVO	28	50,9	18	10	0,912	19	9	0,675	23	5	0,211
INFILTRATIVO	27	49,1	15	12		20	7		18	9	
TUMOR BUDDING											
BAJO GRADO	47	85,5	28	19	0,876	32	15	0,25	34	13	0,317
ALTO GRADO	8	14,4	5	3		7	1		7	1	
INVASIÓN LINFÁTICA											
NO	35	63,64	21	14	0,765	26	9	0,546	28	7	0,62
SI	20	36,36	12	8		13	7		13	7	
INVASIÓN VASCULAR											
NO	48	87,27	29	19	0,327	35	13	0,221	35	13	0,112
SI	7	12,73	4	3		4	3		6	1	
INVASIÓN PERINEURAL											
NO	40	72,73	24	16	0,342	29	11	0,422	31	9	0,441
SI	15	27,27	9	6		10	5		10	5	
EED											
NO	45	81,82	27	18	0,733	32	13	0,523	32	13	0,421
SI	10	18,18	6	4		7	3		9	1	
ILPT											
NO Ó LEVE	36	65,45	20	16	0,728	25	11	0,817	24	12	0,061
DERADO-INTEN	19	34,55	13	6		14	5		17	2	
ILIT (TILs)											
NO Ó LEVE	44	80	27	17	0,691	32	12	0,721	31	13	0,052
DERADO-INTEN	11	20	6	5		7	4		10	1	
IMS											
MSS	45	81,82	30	15	0,032	24	11	0,118	31	14	0,045
MSI-H	10	18,18	3	7		5	5		10	0	

9.2. Figuras

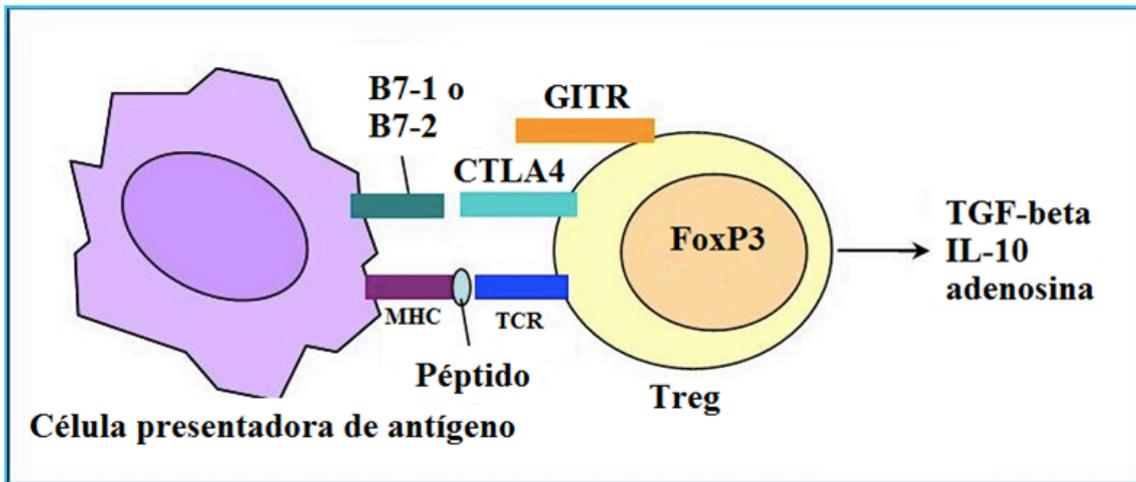


Figura 1. Esquema de la actuación de los Linfocitos Treg y su marcador FOXP3. Moncrieffe H. Regulatory T cell. British Society for Immunology. 2019.

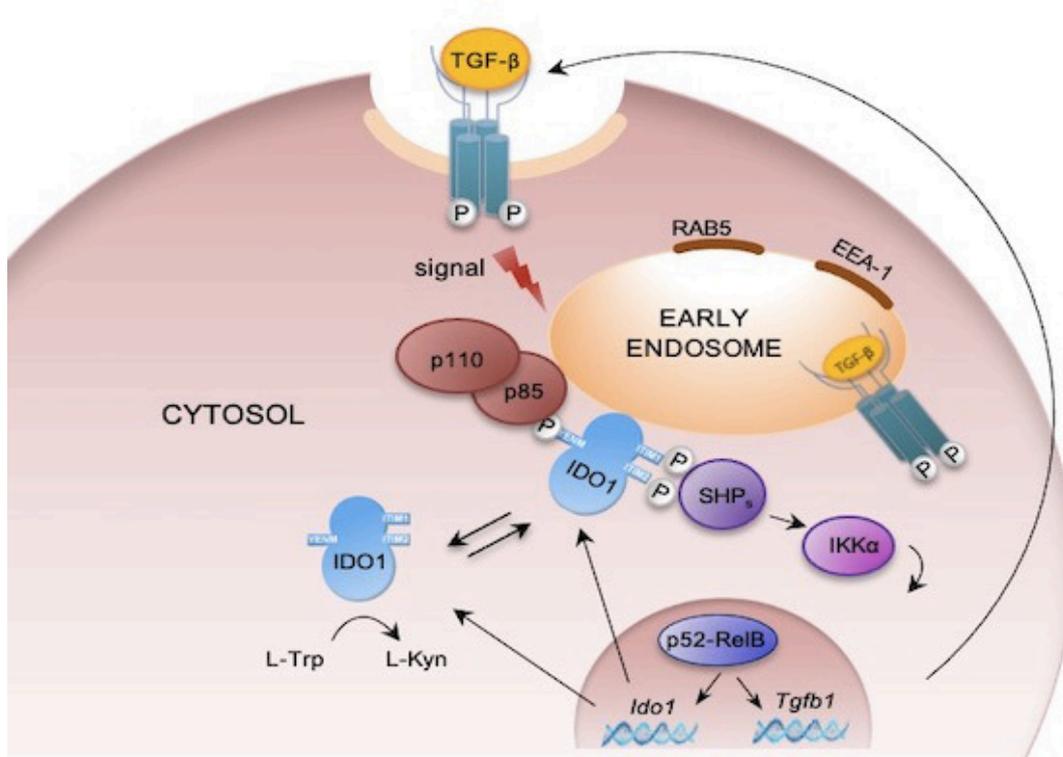


Figura 2. Esquema de la ruta TGF-beta y su relación con IDO-1. Iacomo A et al. Class IA Pi3Ks regulate subcellular and functional dynamics of IDO1. EMBOreport. 2020;21.

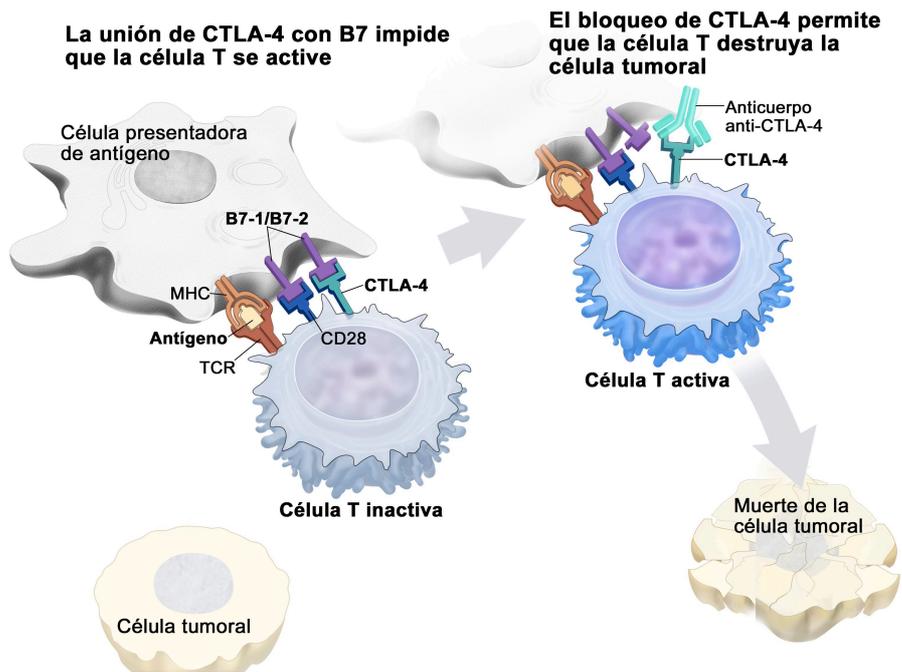


Figura 3. Esquema de la actuación de CTLA4 en los linfocitos T. Diccionario de cáncer. Diccionario del Instituto Nacional del Cáncer.

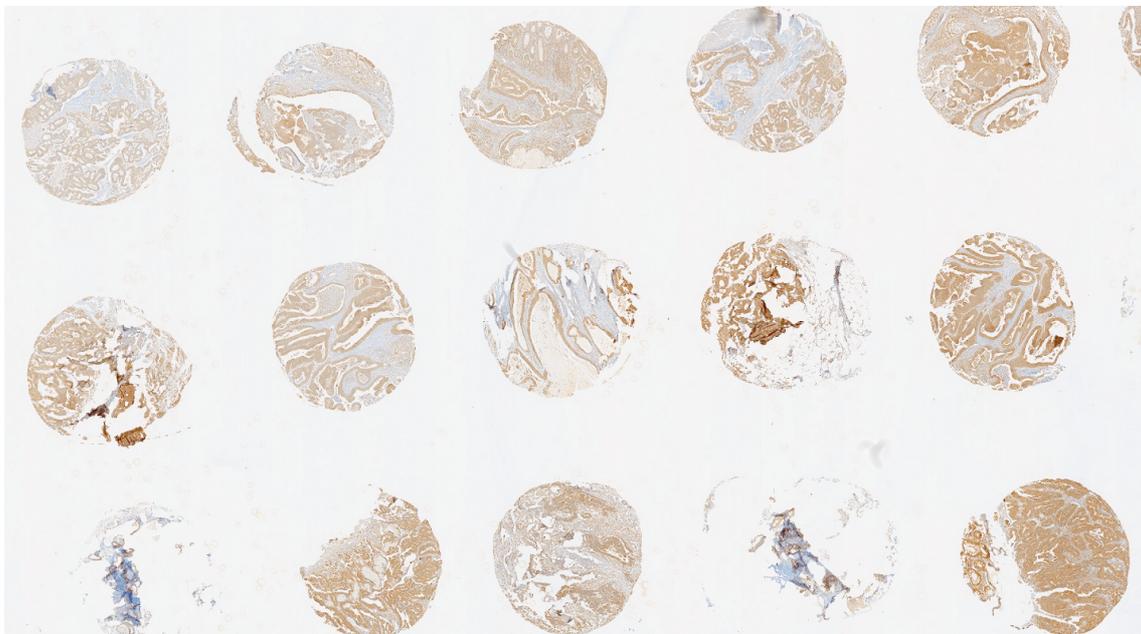
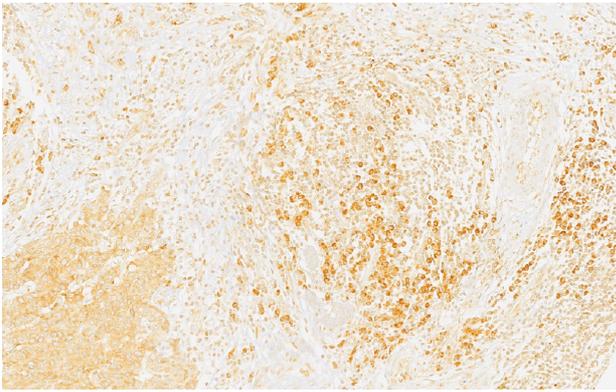
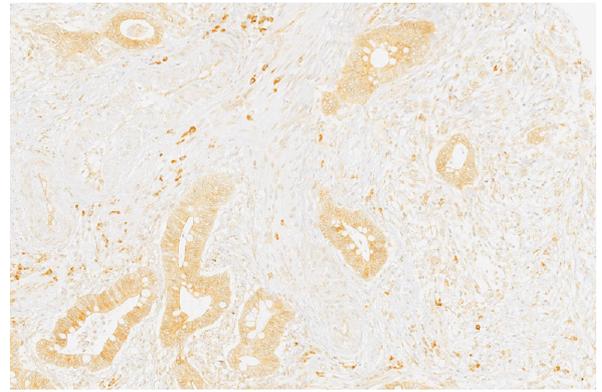


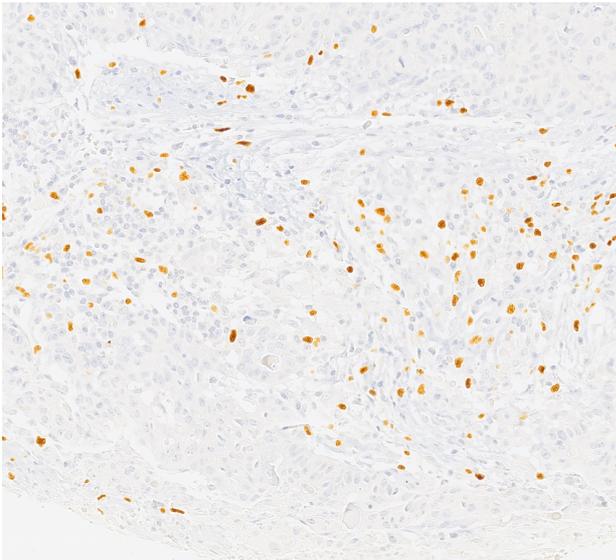
Figura 4. TMA con el anticuerpo CTLA4.



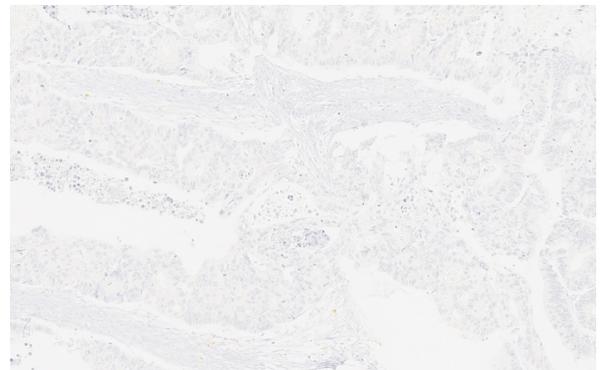
5.1



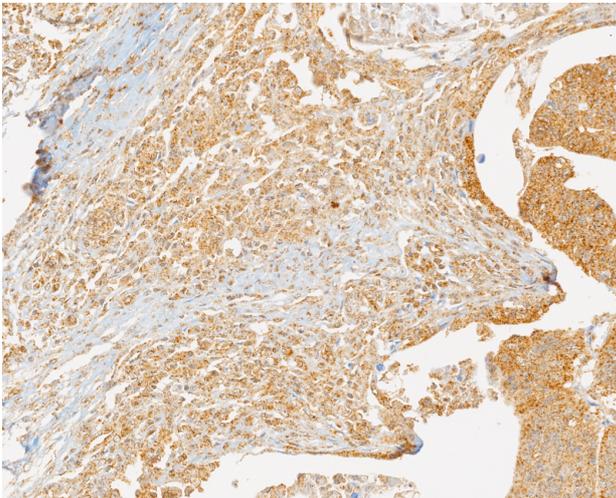
5.2



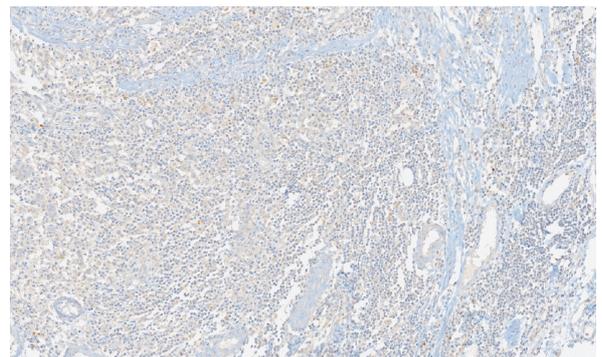
5.3



5.4



5.5



5.6

Figura 5. Imagen de distintos casos de positividad y negatividad para moléculas relacionadas con el checkpoint inmune. - Figura 5.1. Caso de CCR MSI-H esporádico teñido con CTLA4. Tinción positiva (>1). - Figura 5.2. Caso de CS teñido con CTLA4. Tinción negativa (<1). - Figura 5.3. Caso de CCR MSI-H esporádico teñido con FOXP3. Tinción positiva (>1). - Figura 5.4. Caso de CCR NOS teñido con FOXP3. Tinción negativa (<1). - Figura 5.5. Caso de CS teñido con IDO-1. Tinción positiva (>1). - Figura 5.6. Caso de CCR MSI-H teñido con IDO-1. Tinción negativa (<1).

