



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Medicina 3139

TESIS DOCTORAL

**“Apoptosis linfocitaria según receptor TCR-  $\alpha\beta$  y TCR-  $\gamma\delta$  en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon.”**

Memoria presentada por

D<sup>a</sup>. Lorena Galindo Regal

Para optar al grado de

Doctora en Medicina

Directores:

Dr. D. Juan Carlos Andreu Ballester

Dr. D. Antonio Llombart-Cussac

Tutora Dra. D<sup>a</sup>. Cristina Domenech Pérez

Valencia, enero de 2023



TESIS DOCTORAL

**“Apoptosis linfocitaria según receptor TCR- $\alpha\beta$  y TCR- $\gamma\delta$  en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon.”**

Memoria presentada por

D<sup>a</sup>. Lorena Galindo Regal

Valencia, enero de 2023





FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Programa de doctorado en Medicina

TESIS DOCTORAL

**“Apoptosis linfocitaria según receptor TCR- $\alpha\beta$  y TCR- $\gamma\delta$  en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon.”**

Memoria presentada por  
D<sup>a</sup>. Lorena Galindo Regal  
Para optar al grado de  
Doctora en Medicina

Directores:

Dr. D. Juan Carlos Andreu Ballester  
Dr. D. Antonio Llombart-Cussac  
Tutora Dra. D<sup>a</sup>. Cristina Domenech Pérez

Valencia, enero de 2023



**D. Juan Carlos Andreu Ballester**, Doctor en Medicina y jefe de la Unidad de Investigación del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia

**D. Antonio Llombart-Cussac**, Doctor en Medicina y jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Arnau de Vilanova

**Dña. Cristina Domenech Pérez**, Doctora en Medicina. Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de Valencia

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Apoptosis linfocitaria según receptor TCR- $\alpha\beta$  y TCR- $\gamma\delta$  en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon**” corresponde al trabajo realizado bajo su dirección y tutela por Dña. **Lorena Galindo Regal**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat de Valencia.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 16 de enero de 2023.

Firmado:

Dr. Juan Carlos Andreu Ballester

Dr. Antonio Llombart-Cussac

Dra. Cristina Domenech Pérez



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han estado a mi lado en este largo camino.

A mis directores y tutora de tesis doctoral por darme la posibilidad de llevar a cabo este proyecto. Especialmente al Dr. Juan Carlos Andreu Ballester por abrirme las puertas al mundo de la investigación y en particular al de la inmunología, por su apoyo y dedicación día a día y por no dejar que mis ánimos decayeran, gracias por ser mi guía.

A la Fundación FISABIO y al Servicio de Hematología del Hospital Arnau de Vilanova, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

A todas las personas que, de un modo u otro, han participado en este trabajo.

Al Dr. Carlos García Ballesteros, por haberme enseñado tanto, por prestarme su ayuda siempre que la necesité, por ser ejemplo de trabajo y esfuerzo, pero, sobre todo, por ser mi amigo y haber contado con su apoyo en todo momento.

A mi compañero y amigo Alejandro, gracias por cada día que has estado a mi lado, gracias por hacerme sentir como en casa desde el principio.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Dra. M<sup>a</sup> Dolores Miñana, por sus consejos, cariño y apoyo, y a Isabel y Laura. Vosotras que os habéis convertido en mi otra familia, compartiendo cada día durante estos años.

A Óscar, por apoyarme desde el principio y animarme a emprender este proyecto.

A toda mi familia, por empujarme siempre a continuar.

A mi madre, por estar siempre a mi lado de manera incondicional y sostenerme siempre. Por sus buenos consejos, por aguantar mis malos días y reírse conmigo en los buenos, por su amor, entrega y ejemplo de fortaleza. Sin ti esto no hubiera sido posible.

A mi padre, gracias por cada día que me diste. Siempre estarás conmigo.

A mi hijo, mi amor, mi pequeño gran hombre, por ese tiempo en el que entendías que mamá estaba trabajando. Por todos los abrazos y besos que me dieron la fuerza para continuar.



# Índice

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Cáncer Colorrectal .....	6
1.1.1	Epidemiología .....	6
1.1.2	Factores de Riesgo .....	10
1.1.2.1	Factores de riesgo genéticos.....	10
1.1.2.2	Factores de riesgo ambientales.....	11
1.1.3	Clasificación Histológica .....	13
1.1.4	Patrones de Crecimiento y Estadificación.....	16
1.2.	Inmunología y Cáncer .....	20
1.2.1	Mecanismos de evasión inmunológica de las células cancerosas .....	20
1.2.2	Células inmunes implicadas en la protección frente a tumores.....	24
1.2.3	El linfocito T .....	31
1.2.3.1	Estructura de los TCR .....	32
1.2.3.2	Desarrollo y diferenciación de los LT.....	35
1.2.3.3	El Linfocito $T\alpha\beta$ y Linfocito $T\gamma\delta$ .....	37
1.3.	La apoptosis.....	43
1.3.1	Vías de Señalización de la Apoptosis .....	46
1.3.2	Regulación de la Apoptosis.....	47
1.3.3	Las caspasas .....	50
2.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	55
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
3.1	Hipótesis.....	59
3.2	Objetivo Principal.....	59
3.3	Objetivos Secundarios .....	59
4.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	63

4.1	Población de estudio.....	63
4.2	Aparatos y materiales utilizados.....	64
4.2.1	Contador celular.....	64
4.2.2	Citómetro de flujo.....	64
4.2.3	Otros aparatos y materiales utilizados.....	66
4.2.4	Anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias y determinación de su apoptosis.....	66
4.3	Protocolos de CMF empleados.....	70
4.3.1	Compensación de fluorescencias.....	71
4.3.2	Protocolos de marcaje.....	73
4.3.2.1	Protocolo de marcaje para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha/\beta$ , $\gamma/\delta$ y su apoptosis.....	73
4.3.3	Determinación de la positividad para la anexina-V mediante peróxido de hidrógeno.....	79
4.4	Análisis estadísticos.....	81
4.5	Variables del estudio.....	82
4.5.1	Variables hematológicas.....	82
4.5.2	Variables inmunofenotípicas.....	82
4.5.3	Variables clínicas.....	83
4.5.4	Variables histopatológicas.....	84
5	<b>RESULTADOS</b> .....	87
5.1	Distribución y características de los pacientes.....	87
5.2	Frecuencia de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ .....	90
5.3	Apoptosis de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ .....	93
5.4	Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis en pacientes de CC con infiltración tumoral microvascular en tejidos.....	95
5.5	Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis en pacientes con antecedentes de cáncer (AC).....	97
5.6	Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis en pacientes con cáncer sincrónico (CS).....	98

	5.7 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis según estadio de cáncer en pacientes con cáncer de colon (CC). .....	100
	5.8 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis según el grado de diferenciación del tumor en pacientes con cáncer de colon (CC).....	105
	5.9 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis según la localización anatómica del tumor en pacientes con cáncer de colon (CC).....	107
	5.10 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis según la presencia de afectación ganglionar en pacientes con cáncer de colon (CC). .....	109
6	DISCUSIÓN.....	113
7	CONCLUSIONES .....	131
8	BIBLIOGRAFÍA.....	135
9	ANEXOS.....	159



## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AC: antecedentes de cáncer

APAF-1: factor 1 de activación de apoptosis

APC: poliposis adenomatosa coli

APC- Alexa Fluor 700: Allophycocyanin – Alexa Fluor 700

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

BAK: del inglés “Bcl-2 homologous antagonist/Killer”

BCL-2: del inglés “B-cell Leukemia-Lymphoma 2”

CA: antígeno carbohidrato

CARD: dominio de reclutamiento de caspasa

CCR: cáncer colorrectal

CC: cáncer de colon

CCL5: quimiocina cc tipo 5

CCR5: receptor quimiocina cc tipo 5

CDR: regiones determinantes de complementariedad

CD: célula dendrítica

CEA: antígeno carcinoembrionario

CIN: inestabilidad cromosómica

CMF: citometría de Flujo

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

CPA: célula presentadora de antígeno

CXCL13: ligando 13 de la quimiocina

CXCR5: receptor 5 de la quimiocina

CS: cáncer sincrónico

DD: dominio de muerte

DE: desviación estándar

DED: dominio efector de muerte

DN: doble negativo

FADD: proteína con dominio de muerte asociada a FAS

FC: fluorocromo

FITC: isotiocianato Fluoresceína  
FS: dispersión frontal  
HLA: antígeno leucocitario humano  
HNPCC: cáncer colorrectal hereditario sin poliposis  
IFN- $\gamma$ : Interferón  $\gamma$   
IGH: inmunoglobulina pesada  
IL: interleucina  
IMV: infiltración microvascular  
IP: yoduro de propidio  
KIR: killer Immunoglobulin-like Receptor  
KrO: Krome Orange  
LIE: linfocitos intraepiteliales  
LPS: lipopolisacáridos.  
LT: linfocito T  
LTc: linfocitos T citotóxicos  
LTh: linfocitos T colaboradores  
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad  
MSI: inestabilidad microsatelital  
NCAM: molécula de adhesión de la célula neural  
NCR: receptores de citotoxicidad natural  
NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
NK: natural killer  
PAF: poliposis adenomatosa familiar  
PB: pacific Blue  
PBS: tampón fosfato salino  
PC7: R phycoerythrin-Cyanine 7  
PE: R-Phycoerythrin  
PLR: platelet-to-lymphocyte ratio  
PS: fosfatidilserina  
REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer  
SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica  
SNOMED: Systematized Nomenclature of Medicine

SS: dispersion lateral

TAM: macrófagos asociados a tumores

TME: estímulos del microambiente tumoral.

TCR: receptor de célula T

TGF: factor de crecimiento tumoral

TIL: linfocitos infiltrantes de tumor

TLS: estructuras linfoides terciarias

TNF: factor de necrosis tumoral

TNFR: receptor del factor de crecimiento de necrosis tumoral

TNM: Tumor/Nódulos/Metástasis

TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

Treg: Linfocitos T reguladores

7-AAD: 7-amino-actinomicina D



## LISTADO FIGURAS

<b>Fig.1.1</b> Esta ilustración abarca las seis capacidades distintivas en la fisiología celular, compartidas por todos los tipos celulares tumorales, esenciales para el desarrollo del cáncer propuestas originalmente en el año 2000. Hanahan and Weinberg, 2000 <sup>2</sup> .	2
<b>Fig.1.2</b> Esta ilustración añade a las seis anteriores, las cuatro características distintivas propuestas en la última revisión del año 2011. Hanahan and Weinberg 2011, Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation <sup>3</sup> .	3
<b>Fig.1.3</b> Incidencia y Mortalidad de cáncer colorrectal en países desarrollados y en desarrollo. Globocan 2020.	7
<b>Fig.1.4</b> Incidencia de cáncer colorrectal en los países (2020). Globocan de 2020.	8
<b>Fig.1.5.</b> Tasas de supervivencia neta de cáncer a 5 años, ajustada por edad, en España por sexo, tipo de cáncer y periodo (15-99 años). REDECAN <sup>13</sup> .	9
<b>Fig.1.6 -</b> Mayor incidencia de cáncer colorrectal con la edad. Eddy DM. Screening for colorectal cancer. Ann Intern Med. 1990.	12
<b>Fig.1.7</b> Proceso de evolución y desarrollo del CC <sup>32</sup> .	14
<b>Fig.1.8</b> Clasificación por estadios del CCR en función del sistema TNM <sup>48</sup>	18
<b>Fig.1.9.</b> Tipos Celulares Implicados en la Respuesta Inmune, ya sea innata y/o adaptativa (Nature reviews, 2010).	21
<b>Fig.1.10.</b> Activación y regulación de la inmunidad antitumoral <sup>73</sup>	24
<b>Fig.1.11</b> Sinapsis inmune <sup>74</sup> .	26
<b>Fig.1.12</b> Equilibrio entre señales activadoras e inhibitoras que determina si la célula NK atacará o no <sup>77</sup> .	27
<b>Fig.1.13</b> Receptores de activación e inhibición <sup>80</sup> .	28
<b>Fig.1.14.</b> Diferentes estados de activación de los macrófagos <sup>86</sup>	30
<b>Fig.1.15.</b> Proporciones relativas de linfocitos T y de sus tipos y subtipos en sangre humana <sup>93</sup> ...	32
<b>Fig.1.16.</b> Estructura de los complejos TCR $\alpha\beta$ (A) y TCR $\gamma\delta$ (B), donde vemos la región variable (V) con las CDR (región hipervariable) que forman el sitio de unión del Ag y la región constante (C) <sup>96</sup>	33
<b>Fig.1.17.</b> Estructura de los complejos TCR $\alpha\beta$ (izquierda) y TCR $\gamma\delta$ (derecha), que muestra la región extracelular, transmembrana e intracelular <sup>97</sup>	34
<b>Fig.1.18.</b> Desarrollo de células T $\alpha\beta$ , mostrando los distintos marcadores de superficie expresados en las distintas etapas del desarrollo <sup>101</sup> .	36
<b>Fig.1.19.</b> Estructura de los complejos MHC-péptido-TCR <sup>107</sup> .	38

<b>Fig.1.20. Diferenciación de los LTh vírgenes en Th1, Th2, Th17 y Treg y sus principales funciones<sup>110</sup>.</b> .....	39
<b>Fig.1.21. Interacción entre un linfocito CD8+ y una CPA<sup>115</sup>.</b> .....	40
<b>Fig.1.22. Plasticidad funcional de los LT<math>\gamma\delta</math><sup>119</sup>.</b> .....	42
<b>Fig.1.23. Cambios morfológicos que caracterizan a una célula en apoptosis<sup>123</sup>.</b> .....	45
<b>Fig.1.24. Dos vías de señalización de apoptosis. Las dos rutas utilizan caspasas iniciadoras distinta 8 y 9, pero caspasas efectoras comunes<sup>126</sup>.</b> .....	46
<b>Fig.1.25 Vía Extrínseca: activación de caspasas por medio de receptores de muerte, en este caso FAS<sup>132</sup>.</b> .....	48
<b>Fig.1.26 Vía Intrínseca<sup>136</sup>.</b> .....	49
<b>Fig.1.27 Caspasas apoptóticas<sup>141</sup>.</b> .....	50
<b>Fig.4.1 Representación esquemática de espectros de excitación/emisión de los fluorocromos más comunes (Beckman Coulter, Inc).</b> .....	65
<b>Fig.4.2 Protocolo de adquisición de esferas de validación mostrando los picos de fluorescencia media. (Flow-check Pro Fluorospheres, Beckman Coulter, Inc.).</b> .....	70
<b>Fig.4.3 Ejemplo de Curvas de Levey-Jennings donde se registra la evolución del equipo a lo largo del tiempo con el seguimiento de los parámetros de interés.</b> .....	71
<b>Fig.4.4. Representación de un gradiente de densidad con Lymphoprep™, antes (A) y después (B) de la centrifugación.</b> .....	74
<b>Fig.4.5. Estrategia de gating de citometría de flujo que se siguió para diferenciar las diferentes subpoblaciones de células T. Desde sangre periférica, medimos los eventos enfrentando los parámetros de forward y side scatter y seleccionamos las CD45 positivas con lo que obtenemos los linfocitos totales.</b> .....	77
<b>Fig.4.6. Estrategia de gating de citometría de flujo que se siguió para diferenciar a partir de los linfocitos totales, las distintas subpoblaciones linfocitarias.</b> .....	77
<b>Fig.4.7. Las células CD3+CD56+ se analizaron en paralelo desde linfocitos totales.</b> .....	78
<b>Fig.4.8. % de células Anexina V+ basal</b> .....	79
<b>Fig.4.9. % de células Anexina V+ a una concentración 25mM de peróxido de hidrógeno.</b> .....	79
<b>Fig.4.10. % de células Anexina V positivas a una concentración 50 mM de peróxido de hidrógeno respectivamente</b> .....	80
<b>Fig.4.11. Medimos la apoptosis de las distintas subpoblaciones celulares seleccionadas previamente, enfrentando los parámetros 7AAD frente a Anexina V.</b> .....	80
<b>Fig.5.1. Frecuencia de linfocitos T <math>\gamma\delta</math> frente a linfocitos T <math>\alpha\beta</math> en sangre periférica</b> .....	90

<b>Fig.5.2. Estrategia de gating, donde observamos diferencia en el porcentaje de linfocitos T <math>\gamma\delta</math>, si comparamos voluntarios sanos (A) vs pacientes con CC (B).....</b>	<b>91</b>
<b>Fig.5.3 Histograma de análisis LT<math>\gamma\delta</math> CD4/CD8.....</b>	<b>92</b>
<b>Fig.5.4. Frecuencia de subpoblaciones de células T, <math>\alpha\beta</math> y <math>\gamma\delta</math> (panel A y B) en sangre periférica de cáncer de colon (CC) vs sujetos sanos (control). Se muestran los valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (Mann Whitney U Test). (*p &lt; 0.001). Los resultados se expresan como medias <math>\pm</math> DE (Barras T).....</b>	<b>93</b>
<b>Fig.5.5 Apoptosis en voluntarios sanos (A) vs pacientes con CC (B) en las subpoblaciones celulares LT<math>\alpha\beta</math> y <math>\gamma\delta</math>. Se muestran los porcentajes de apoptosis.....</b>	<b>94</b>
<b>Fig.5.6. Apoptosis de subpoblaciones de células T, <math>\alpha\beta</math> y <math>\gamma\delta</math> (panel A y B) en sangre periférica de cáncer de colon (CC) vs sujetos sanos (control). Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (Mann Whitney U Test). (*p &lt; 0.001). Los resultados se expresan como medias <math>\pm</math> DE (Barras T). .....</b>	<b>95</b>
<b>Fig.5.7. Infiltración tumoral microvascular. Frecuencia de subpoblaciones de células T, <math>\alpha\beta</math> y <math>\gamma\delta</math> (panel A y B) y apoptosis (panel C y D). Se muestran los porcentajes de apoptosis y valores absolutos de las células. Pacientes con cáncer de colon según la infiltración tumoral microvascular (IMV) en tejidos (n = 7). Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). (*p &lt; 0,05). Los resultados se expresan como medias <math>\pm</math> DE (Barras T).....</b>	<b>96</b>
<b>Fig.5.8 Antecedente de cáncer. Frecuencia de subpoblaciones de células T, <math>\alpha\beta</math> y <math>\gamma\delta</math> (panel A y B) y apoptosis (panel C y D) en pacientes con cáncer de colon con antecedentes de cáncer (AC) (n = 15). Se muestran los porcentajes de apoptosis y valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). (*p &lt; 0,05). Los resultados se expresan como medias <math>\pm</math> DE (Barras T). .....</b>	<b>98</b>
<b>Fig.5.9 Cáncer sincrónico (CS). Frecuencia de subpoblaciones de células T, <math>\alpha\beta</math> y <math>\gamma\delta</math> (panel A y B) y apoptosis (panel C y D) en sangre periférica en pacientes con cáncer de colon con cáncer sincrónico (CS) (n = 7). Se muestran los porcentajes de apoptosis. Y valores absolutos de las células. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). (*p &lt; 0,05). Los resultados se expresan como medias <math>\pm</math> DE (Barras T).....</b>	<b>99</b>
<b>Fig.5.10 Apoptosis de células T, según el estadio del cáncer. Se muestran los porcentajes de apoptosis.....</b>	<b>100</b>
<b>Fig.5.11 Apoptosis de las subpoblaciones de células T <math>\alpha\beta</math>, según el estadio del cáncer. Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns. ....</b>	<b>101</b>
<b>Fig.5.12 Apoptosis de subpoblaciones de células T <math>\gamma\delta</math>, según el estadio del cáncer. Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.....</b>	<b>102</b>
<b>Fig.5.13 Frecuencia de subpoblaciones de células T <math>\alpha\beta</math>, según el estadio del cáncer. Se muestran los valores absolutos de las células. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns. ...</b>	<b>103</b>
<b>Fig.5.14 Frecuencia de subpoblaciones de células T <math>\gamma\delta</math>, según el estadio del cáncer. Se muestran los valores absolutos de las células. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). (*p &lt; 0,05). .....</b>	<b>104</b>

<b>Fig.5.15 Apoptosis de células T, según el grado de diferenciación del tumor.</b> Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.....	105
<b>Fig.5.16 Frecuencia de células T, según el grado de diferenciación del tumor.</b> Se muestran los valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.....	106
<b>Fig.5.17 Apoptosis de células T, según la localización anatómica del tumor.</b> Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.....	107
<b>Fig.5.18 Frecuencia de células T, según la localización anatómica del tumor.</b> Se muestran los valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.....	108
<b>Fig.5.19 Apoptosis de células T, según la presencia de afectación ganglionar.</b> Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.....	109
<b>Fig.5.20 Frecuencia de células T, según la presencia de afectación ganglionar.</b> Se muestran los valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.....	110

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.1. Clasificación TNM para carcinoma colorrectal (8ª edición de la AJCC)46.....</b>	<b>17</b>
<b>Tabla 4.1 Principales características de los fluorocromos utilizados.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabla 4.2 Principales características de los anticuerpos utilizados para la determinación de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 4.3 Principales características de los anticuerpos utilizados para la determinación de la apoptosis de las distintas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabla 4.4 Matriz de compensación. ....</b>	<b>72</b>
<b>Tabla 4.5 Panel de anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de las subpoblaciones y apoptosis.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 4.6 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov, con la corrección de la significación de Lilliefors para las distintas subpoblaciones celulares. ....</b>	<b>81</b>
<b>Tabla 4.7 Variables fenotípicas estudiadas para cada población celular. ....</b>	<b>83</b>
<b>Tabla 4.8 Variables clínicas. Datos recogidos a partir de la revisión de la historia clínica de los pacientes. ....</b>	<b>83</b>
<b>Tabla 4.9 Variables histopatológicas. Datos recogidos mediante la revisión del informe anatomopatológico correspondiente a la pieza colónica resecada. ....</b>	<b>84</b>
<b>Tabla 5.1. Rasgos demográficos, clínicos y anatomopatológicos de pacientes con cáncer de colon. Desviación estándar (DE), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno carbohidrato (CA), edad de los hombres vs edad de las mujeres, <math>p=0.850</math>. Tipo Histológico código (OMS) SNOMED (Systematized Nomenclature of Medicine), Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM). ....</b>	<b>89</b>
<b>Tabla 5.2. Análisis estadístico comparativo de la distribución de medias de los hemogramas de pacientes con CC vs voluntarios sanos. ....</b>	<b>89</b>



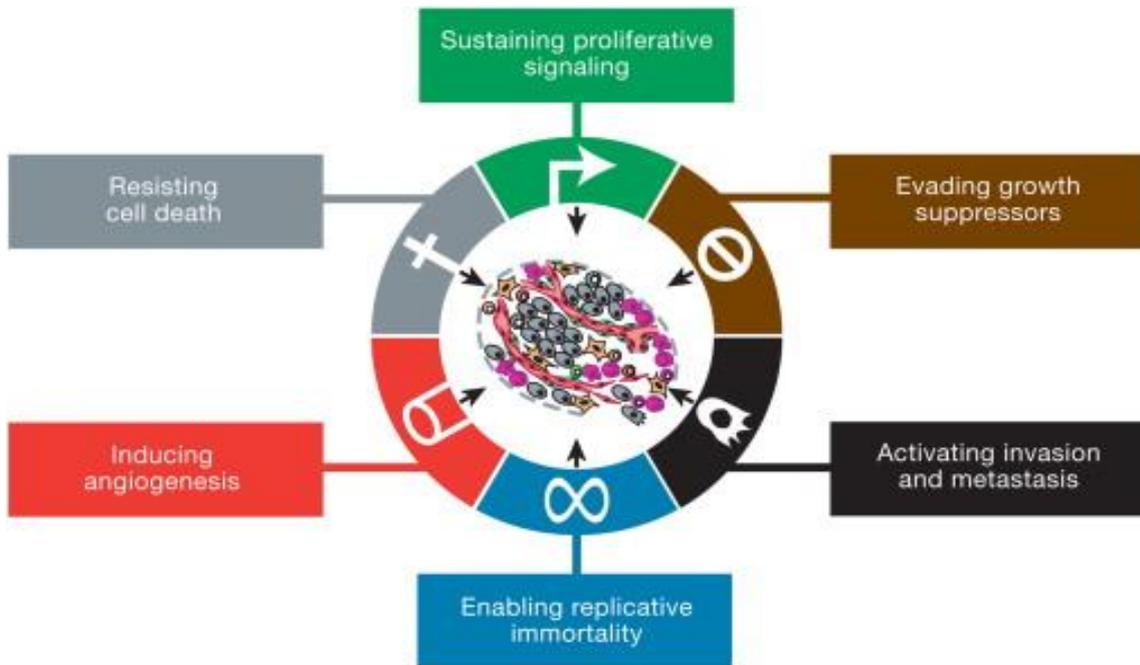
# 1.INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

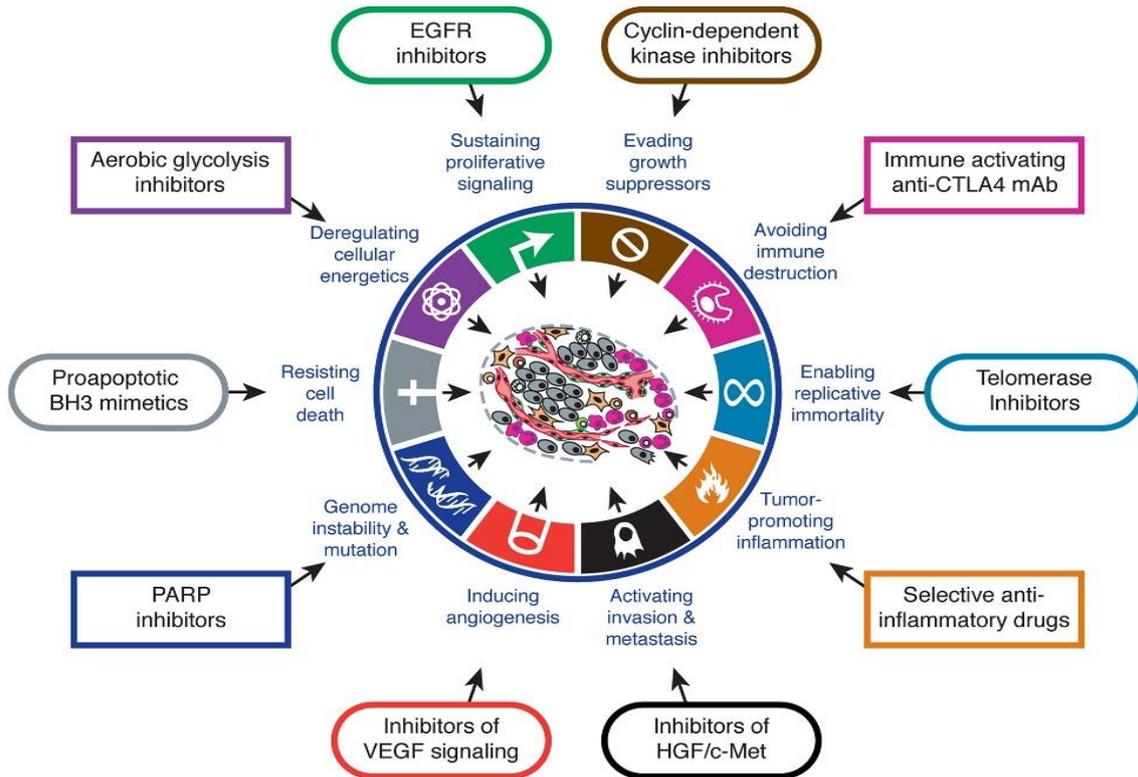
El cáncer en la actualidad constituye un importante problema de salud pública, es la segunda causa de muerte, (22,8% de los fallecimientos), por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio (24,3% de las muertes), según datos del INE de 2020. Comprende un conjunto de patologías que pueden afectar a distintos tipos de células y tejidos, y todos ellos tienen en común el crecimiento descontrolado y desordenado de las células neoplásicas. Hay una transformación de células normales en células tumorales, las cuales pueden adquirir la capacidad de diseminarse desde el tejido de origen hacia otros tejidos y órganos, en el proceso conocido como metástasis. Estas alteraciones son el resultado de la interacción de los factores genéticos del individuo, la edad y agentes externos (carcinógenos físicos, químicos y biológicos). La tumorigénesis, proceso de formación y desarrollo de un tumor comprende varias etapas que implican cambios dinámicos en el genoma.

Hanahan y Weinberg postularon en el año 2000 un modelo unificador que proponía seis características o alteraciones en la fisiología celular compartidas por todos los tipos celulares tumorales, esenciales para el desarrollo del cáncer (Hallmarks of cancer). Estas alteraciones se definen como capacidades funcionales adquiridas por las células tumorales, vía distintos mecanismos y en varios momentos durante el curso de la formación y desarrollo del tumor, que les confieren ventajas en supervivencia, proliferación y diseminación<sup>1</sup>.



**Fig.1.1** Esta ilustración abarca las seis capacidades distintivas en la fisiología celular, compartidas por todos los tipos celulares tumorales, esenciales para el desarrollo del cáncer propuestas originalmente en el año 2000. Hanahan and Weinberg, 2000<sup>2</sup>.

Posteriormente se propuso la necesidad de incorporar a estas seis características, otras 4 propiedades distintas que presentan las células cancerosas fundamentales también para el desarrollo del cáncer. Además, en su última revisión, estos autores defienden que la biología de los tumores no puede entenderse simplemente por la enumeración de los rasgos del cáncer, sino que debe englobar también la contribución del microambiente tumoral<sup>3</sup>.



**Fig.1.2** Esta ilustración añade a las seis anteriores, las cuatro características distintivas propuestas en la última revisión del año 2011. Hanahan and Weinberg 2011, Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation<sup>3</sup>.

1. Independencia de las señales de crecimiento.

Las células cancerosas estimulan su propio crecimiento. Las células normales requieren señales mitogénicas para pasar de un estado quiescente a un estado proliferativo, es decir requieren que les llegue la información que provoca la división celular o mitosis. Por el contrario, las células tumorales pueden crecer sin necesidad de que se produzcan dichas interacciones, ya que o bien generan muchas de sus propias señales de crecimiento o bien activan desde el interior celular a los receptores transmembrana en ausencia de ligando, reduciendo así su dependencia de la estimulación desde el microambiente del tejido normal.

2. Insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento.

Resisten las señales inhibitoras que de lo contrario podrían detener su

crecimiento. Múltiples señales antiproliferativas funcionan en las células normales para mantener la quiescencia celular y la homeostasis tisular. Esto permite la proliferación celular y hace a las células insensibles frente a los factores que evitan el crecimiento.

### 3. Evasión de la apoptosis.

La capacidad de las poblaciones de células tumorales para expandirse en número está determinada por una ratio entre mitosis y muerte celular por necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La resistencia a la apoptosis por parte de las células tumorales puede darse según diferentes estrategias, siendo la más común la pérdida de función del regulador proapoptótico TP53, debido a mutaciones en dicho gen. De esta manera se consigue eliminar un componente clave que induce la apoptosis cuando se detecta daño en el ADN.

### 4. Potencial replicativo ilimitado.

Las células de mamíferos tienen un programa específico que limita el número de divisiones celulares que pueden ocurrir (60-70 duplicaciones), el límite de Hayflick, pasado el cual, dichas células detienen su crecimiento e inician un proceso denominado senescencia<sup>4</sup>. La senescencia en las células normales es producida debido a la pérdida de la función protectora de los telómeros, por su acortamiento. En cambio, en las células neoplásicas se ha evidenciado el mantenimiento de la longitud de los telómeros en la mayoría de los tipos de cáncer<sup>5</sup>, debido a una mayor actividad de la enzima telomerasa, de modo que se pueden multiplicar para siempre.

### 5. Angiogénesis sostenida.

La angiogénesis forma parte también de las principales características de las células tumorales. Las células cancerosas estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos para un mayor aporte de oxígeno y nutrientes a los tumores. La generación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para que el tumor pueda crecer<sup>6</sup>. Los tumores tienen la capacidad de activar la angiogénesis.

### 6. Invasión tisular y metástasis.

Las células neoplásicas tienen la capacidad de invasión tisular, lo que les permite escapar de la masa tumoral primaria y colonizar otras partes del cuerpo (metástasis). Al igual que en el tumor primario, el éxito en estos procesos depende de la adquisición de las cinco características anteriores. Los procesos de invasión y metástasis son extremadamente complejos, implicando cambios en las relaciones físicas entre las células y su microambiente y la activación de las proteasas extracelulares.

### 7. Inestabilidad genómica y mutación.

La adquisición de las 6 características anteriores depende en gran medida de una sucesión de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas. Los sucesivos pasos de la progresión tumoral pueden ser entendidos como una secuencia de expansiones clonales, cada una de las cuales es provocada por la adquisición de un genotipo mutante favorable que resulta en una ventaja selectiva.

### 8. Inflamación.

Se ha comprobado que tejidos crónicamente inflamados son más susceptibles a desarrollar tumores. La inflamación es evidente en muchos casos en estadios tempranos del cáncer y por ello, se ha incluido como otro de los puntos esenciales del proceso neoplásico. Sustentan esta inclusión, estudios que demuestran que ciertos mecanismos relacionados con la inflamación producen inestabilidad genética permitiendo la acumulación de alteraciones moleculares.

### 9. Reprogramación del metabolismo energético.

La enfermedad neoplásica implica también a los ajustes correspondientes en el metabolismo energético con el fin de estimular el crecimiento y la división celular. Otto Warburg fue el primero en observar una característica anómala en el metabolismo energético de las células cancerosas que denominó “glicólisis aerobia”<sup>7</sup>.

## 10. Evasión del sistema inmunológico.

La aparición de tumores parece reflejar, de alguna manera, que las células cancerosas han logrado evitar la detección por parte del sistema inmune o han sido capaces de limitar el alcance de la destrucción inmunológica, mediante la desactivación de componentes del sistema inmune que han sido enviados para eliminarlas.

### 1.1. Cáncer Colorrectal

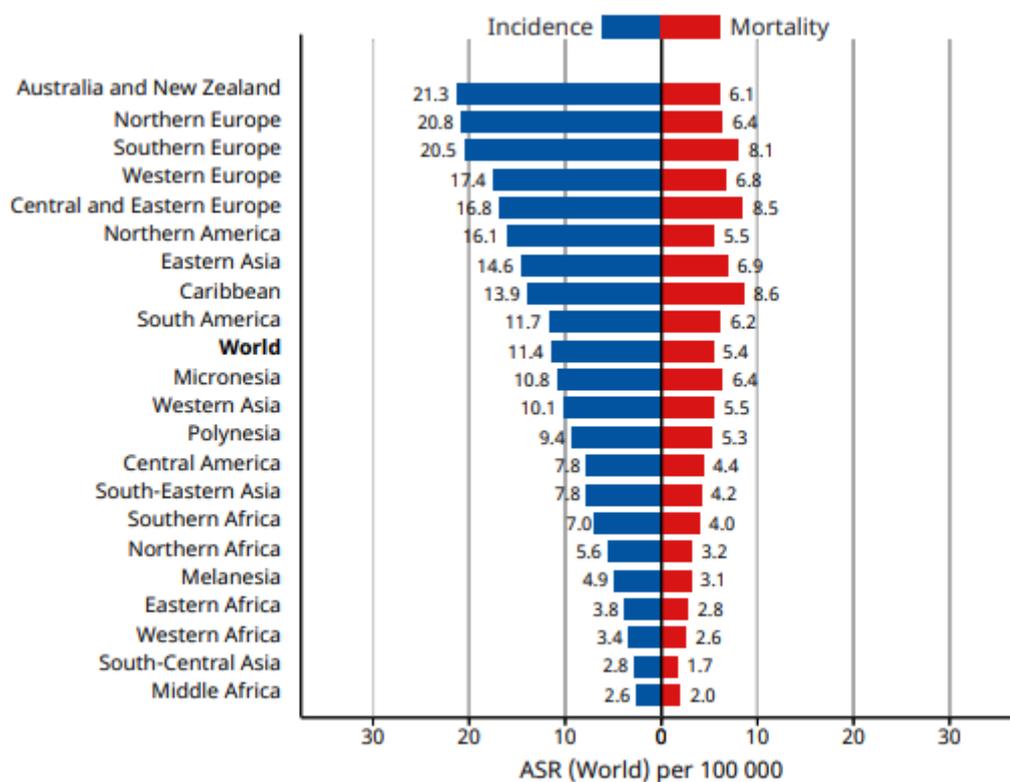
El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes en la mayoría de los países. Es una enfermedad común y letal asociada tanto a factores ambientales como genéticos, siendo la evasión de la muerte celular programada (apoptosis) y el bloqueo de los mecanismos de inmunidad, algunos de los cambios esenciales de la transformación maligna<sup>3</sup>.

El cáncer colorrectal se produce en el revestimiento del intestino grueso. Surge de la mucosa del intestino, generalmente creciendo hacia el lumen y/o extendiéndose a órganos adyacentes. Los síntomas están asociados con tumores relativamente grandes y/o etapas avanzadas de la enfermedad. Generalmente no son específicos del cáncer de colon: cambio en los hábitos intestinales, dolor abdominal, pérdida de peso sin otras causas aparentes, debilidad, deficiencia de hierro y anemia son los síntomas más comunes, y depende de la ubicación y etapa del tumor primario<sup>8</sup>.

#### 1.1.1 Epidemiología

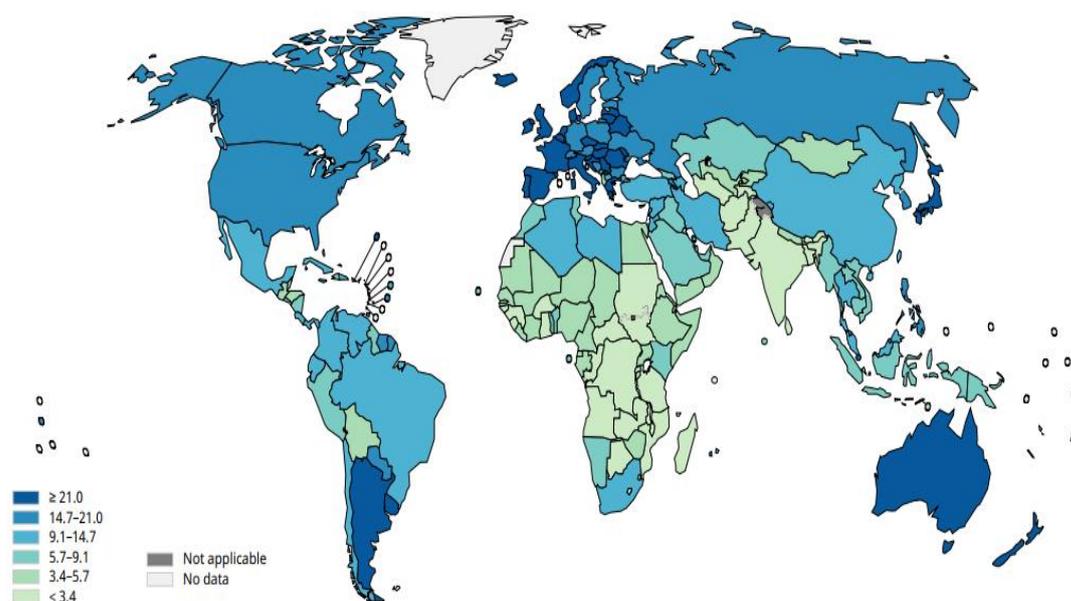
A nivel mundial el CCR representa casi un 10% del total de cánceres<sup>9</sup>. Es el tercero más comúnmente diagnosticado en varones y el segundo en las mujeres, con 1,4 millones de nuevos casos y casi 694.000 muertes en 2012<sup>10</sup>, variando a lo largo de las diferentes áreas geográficas según los últimos datos publicados en la base de datos

Globocan de 2020.



**Fig.1.3 Incidencia y Mortalidad de cáncer colorrectal en países desarrollados y en desarrollo. Globocan 2020.**

Las tasas de incidencia más altas se encuentran en Australia y Nueva Zelanda, Europa y América del norte, y las tasas más bajas se encuentran en África y en Asia meridional y Central<sup>11</sup> (Figura 1.3). Estas diferencias geográficas parecen ser atribuibles a diferencias en la dieta y exposición a riesgos ambientales que se suman a un fondo genético de determinada susceptibilidad.



**Fig.1.4 Incidencia de cáncer colorrectal en los países (2020). Globocan de 2020.**

Las tasas de incidencia y mortalidad del CCR varían notablemente en todo el mundo. Es importante constatar el incremento que está sufriendo la incidencia de cáncer en España y el contraste que supone frente a la evolución de la mortalidad.<sup>12</sup> Según las estimaciones de la base de datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN)<sup>13</sup> de 2022, el número total de casos incidentes estimados para 2022 es de 280.100 de los que 160.066 son en hombres y 120.035 en mujeres. En el conjunto de la población, el tumor más frecuente es el de colon y recto con un total de 43.370 nuevos casos (28.706 de colon y 14.664 de recto).

TIPO DE CÁNCER	HOMBRES			MUJERES		
	SN 2002-2007	SN 2008-2013	% variación entre periodos	SN 2002-2007	SN 2008-2013	% variación entre periodos
Cavidad oral y Faringe	37,4	38,2	2,1	51,6	57,2	10,9
Esófago	9,7	13,1	35,1	17,3	15,7	-9,2
Estómago	24,6	26,0	5,7	30,6	30,3	-1,0
Colon	57,5	63,1	9,7	59,8	63,9	6,9
Recto	64,3	68,2	6,1	58,1	62,7	7,9
Hígado	15,2	17,9	17,8	16,4	16,2	-1,2
Vesícula y vías biliares	18,5	21,8	17,8	17,8	18,8	5,6
Páncreas	5,7	7,2	26,3	7,3	10,0	37,0
Laringe	60,6	60,0	-1,0	68,5	66,1	-3,5
Pulmón	11,2	12,7	13,4	16,2	17,6	8,6
Melanoma cutáneo	79,1	82,3	4,0	88,6	88,9	0,3
Mama				83,2	85,5	2,8
Cuello uterino				64,4	65,5	1,7
Cuerpo uterino				74,6	74,0	-0,8
Ovario				37,5	40,9	9,1
Próstata	87,9	89,8	2,2			
Testículo	86,1	89,2	3,6			
Riñón	59,8	64,8	8,4	61,4	65,8	7,2
Vejiga urinaria	72,3	73,8	2,1	72,9	75,9	4,1
Encefalo	19,3	20,8	7,8	21,2	24,2	14,2
Tiroides	78,3	86,1	10,0	88,8	93,1	4,8
Linfoma de Hodgkin	80,0	80,6	0,8	83,3	82,6	-0,8
Linfomas no hodgkinianos	57,2	62,4	9,1	63,0	68,4	8,6
Mieloma	40,1	44,8	11,7	42,5	51,2	20,5
Leucemia linfática crónica	78,8	77,7	-1,4	80,7	80,7	0,0
Leucemia linfática aguda	35,1	41,1	17,1	37,4	40,1	7,2
Leucemia mieloides crónica	59,2	68,8	16,2	67,5	73,0	8,1
Leucemia mieloides aguda	17,0	19,2	12,9	19,8	24,9	25,8
<b>Todos</b>	<b>52,0</b>	<b>55,3</b>	<b>6,3</b>	<b>59,1</b>	<b>61,7</b>	<b>4,4</b>

**Fig.1.5. Tasas de supervivencia neta de cáncer a 5 años, ajustada por edad, en España por sexo, tipo de cáncer y periodo (15-99 años). REDECAN<sup>13</sup>.**

La supervivencia del CCR, aunque de forma ligera, ha mejorado en los últimos años en España (Figura 1.5), y es similar a la del resto de países de nuestro entorno. Esto podría ser debido gracias a los avances tecnológicos, a los nuevos tratamientos y al diagnóstico cada vez más precoz de los tumores, mediante las políticas de prevención, tanto primaria como secundaria y a la posterior eliminación de pólipos de colon en fases tempranas de la tumorigénesis.

Los esfuerzos actuales para reducir la incidencia de CCR y su mortalidad en adultos jóvenes se centran en la identificación de las personas para la vigilancia basada

en antecedentes familiares, y promover la conciencia sobre el potencial riesgo de cáncer y los síntomas como sangrado rectal persistente, a cualquier edad<sup>14</sup>.

En contraste con estos datos, las tasas de mortalidad siguen aumentando en muchos países con recursos limitados y con peores infraestructuras sanitarias, sobre todo en Europa del Este, América Central y América del Sur<sup>15</sup>.

### 1.1.2 Factores de Riesgo

La etiología del CCR es compleja; incluye factores ambientales y genéticos. El riesgo de desarrollar CCR depende de factores que se pueden clasificar en factores de comportamiento (como fumar, el alto consumo de carne roja, la obesidad, inactividad física), que se pueden evitar y factores genéticamente determinantes y envejecimiento, que no pueden evitarse. De modo que existen diferentes factores ambientales y genéticos que pueden aumentar la probabilidad de desarrollar CCR<sup>16</sup>.

#### 1.1.2.1 Factores de riesgo genéticos

Los factores de riesgo genéticos, conocidos como síndromes hereditarios asociados a CCR, son varios trastornos genéticos específicos, la mayoría de los cuales se heredan de forma autosómica dominante. En conjunto tan sólo representan alrededor del 5 % de todos los casos de CCR<sup>17</sup>. La poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis [HNPCC]) son los más comunes entre los síndromes de cáncer de colon familiar. El Síndrome de Lynch, representa aproximadamente el 3% de todos los adenocarcinomas de colon. Se debe sospechar especialmente cuando el paciente presenta antecedentes familiares de CCR, carcinoma de endometrio, y otros tipos de cáncer. Es un síndrome causado por la mutación en la línea germinal de uno de los cuatro genes encargados de la reparación del DNA. Estas son proteínas que normalmente participan en la reparación del DNA durante su

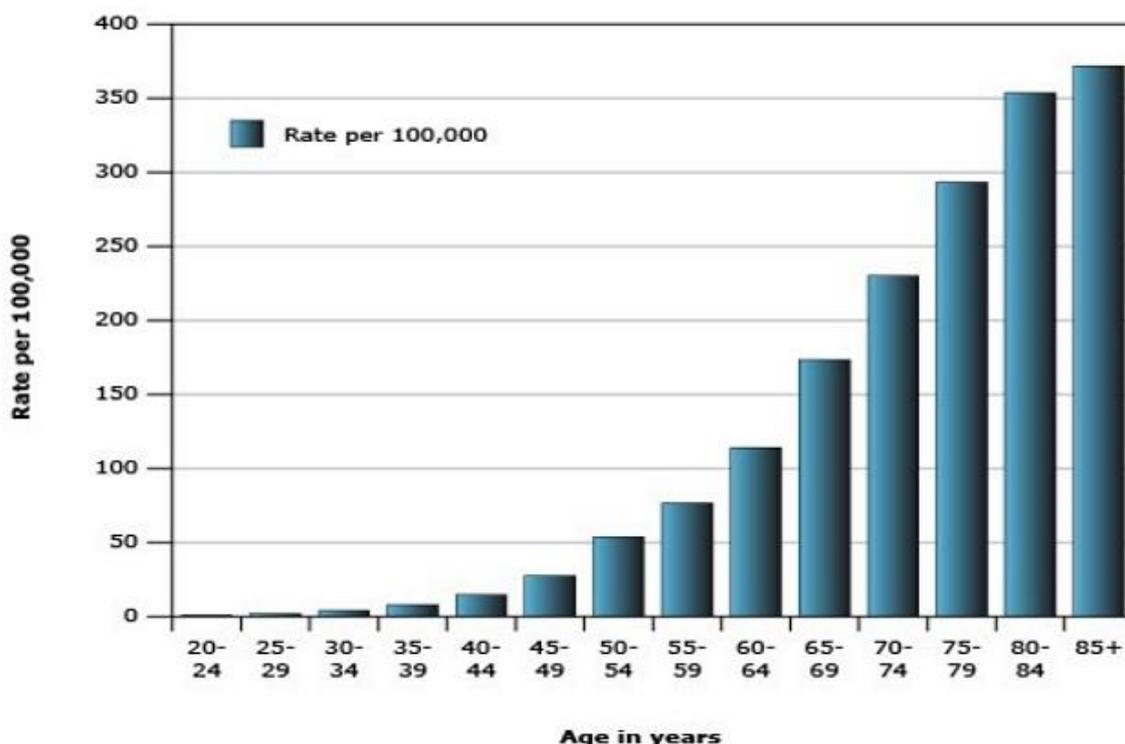
replicación, y funcionan dentro de un complejo molecular dispuesto en pares, MLH1-PMS2 y MSH2-MSH6<sup>18</sup>. La alteración de estos genes dará lugar a un gran número de mutaciones, originando secuencias nucleotídicas cortas repetitivas del DNA o microsatélites repartidos a través del genoma, fenómeno denominado inestabilidad microsatelital (MSI)<sup>19</sup>. Los tumores colorrectales que se desarrollan en pacientes con síndrome de Lynch se caracterizan porque tienen una edad de aparición temprana (aproximadamente 44 años) y por la tendencia a desarrollar las lesiones en el colon proximal y tener más riesgo de padecer cáncer sincrónico o metacrónico. En algunos pacientes se presenta en su tercera década de vida<sup>20</sup>.

La PAF y sus variantes (síndrome de Gardner, síndrome de Turcot y poliposis adenomatosa familiar atenuada) representan menos desintegrarla en el 1% o de los cánceres colorrectales. La PAF es causada por mutaciones en la línea germinal del gen de la poliposis adenomatosa dcoli (APC), es un gen supresor de tumores, que se localiza en el cromosoma 5<sup>21</sup>. La PAF típica se caracteriza por el desarrollo de numerosos adenomas en el recto y el colon durante la segunda década de vida. Generalmente, los cánceres comienzan a desarrollarse una década después de la aparición de los pólipos. La mayoría de los pacientes con PAF desarrollan CRC entre los 40 y 50 años.

### 1.1.2.2 Factores de riesgo ambientales

Los factores de riesgo ambientales incluyen el tipo, calidad y cantidad de la dieta y el estilo de vida, comportamientos potencialmente modificables como la inactividad física y fumar.

Del mismo modo la edad también es un factor importante para el desarrollo de CCR, infrecuente antes de los 40 años; la incidencia comienza a aumentar significativamente entre las edades de 40 y 50 y se observa el aumento de las tasas de incidencia específicas por edad en cada década sucesiva después de eso (Figura 1.6)<sup>22</sup>.



**Fig.1.6 - Mayor incidencia de cáncer colorrectal con la edad. Eddy DM. Screening for colorectal. cancer. Ann Intern Med. 1990.**

En los últimos 20 años, según informe del SEOM<sup>23</sup>, el número de tumores diagnosticados ha experimentado un crecimiento constante en España debido no sólo al aumento poblacional, sino también a las técnicas de detección precoz y al aumento de la esperanza de vida (ya que el riesgo de desarrollar tumores aumenta con la edad).

Datos procedentes de la base de datos de vigilancia y epidemiología de los Estados Unidos (SEER)<sup>24</sup> y otros registros de cáncer de países occidentales sugieren que la incidencia CCR está aumentando en el grupo de menores de 50 años, mientras que está disminuyendo en los grupos de mayor edad<sup>25-26</sup>.

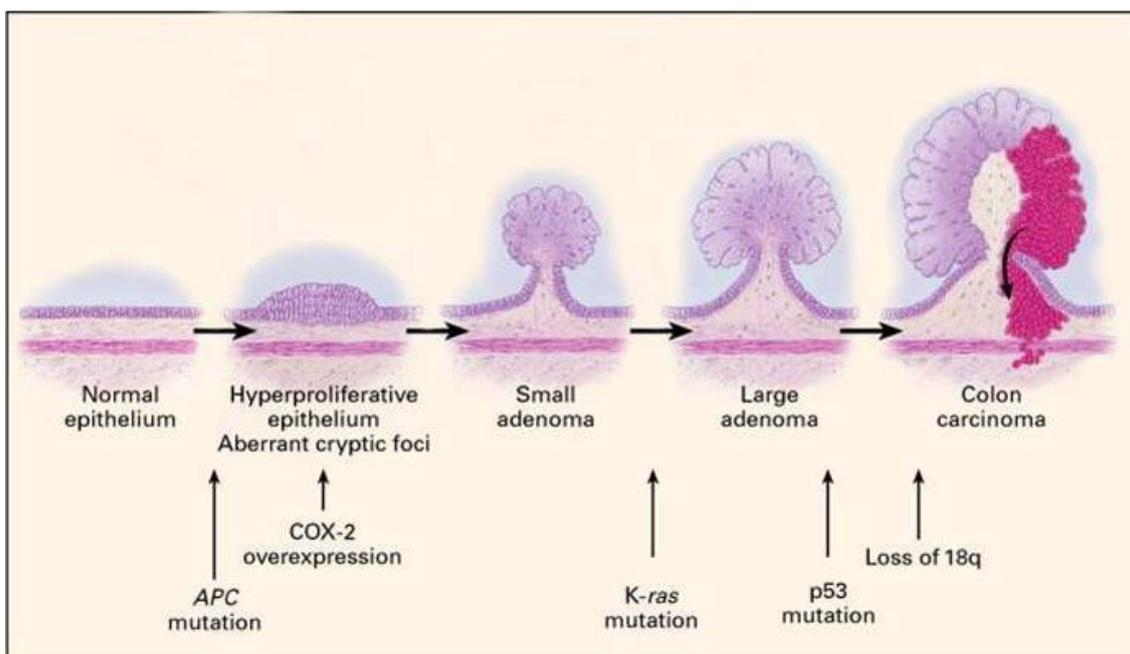
El bajo estatus socioeconómico también se asocia con un mayor riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal. Un estudio mostró como que en las personas con bajo nivel socioeconómico el riesgo de desarrollar CCR tenía una incidencia desproporcionadamente alta, independientemente de los efectos de los factores de riesgo de CCR a nivel individual<sup>27</sup>.

El consumo de tabaco conlleva un aumento del riesgo relativo de 1,18 (95% CI

1,11-1,25) de desarrollar CCR frente a no fumadores, tal y como se observó en un metanálisis de 106 estudios observacionales<sup>28</sup>. Así mismo el consumo de carne roja cocinada a alta temperatura, probablemente por la producción de hidrocarburos poliaromáticos y otros carcinógenos también ha sido asociado con un aumento del riesgo de desarrollo de CCR<sup>29</sup>. La ingesta de alcohol también se ha asociado con un mayor riesgo de CCR. Los bebedores moderados presentan un aumento significativo en el riesgo de CCR frente a los no bebedores<sup>30</sup>.

### 1.1.3 Clasificación Histológica

La mayoría de los cánceres de colon se inician de manera escalonada, a partir de un crecimiento de las células de la mucosa intestinal, hasta transformarse en un pólipo (protuberancia benigna y visible que se proyecta en la superficie de la capa interna del intestino). Existen diferentes tipos de pólipos, pero sólo los pólipos adenomatosos (adenomas) intervienen en el proceso de formación del cáncer de colon. Hay que tener en cuenta que los adenomas son procesos benignos y no peligrosos para la vida. Sin embargo, con el paso del tiempo, si no se extirpan y permanecen en el intestino, algunos de ellos se pueden malignizar y convertirse en un cáncer<sup>31</sup>. Por esta razón, una manera de prevenir el cáncer de colon es detectar y extirpar dichos pólipos antes de que se conviertan en cáncer.



**Fig.1.7** Proceso de evolución y desarrollo del CC<sup>32</sup>.

Las neoplasias colorrectales más frecuentes son los adenomas y los carcinomas. La gran mayoría de los carcinomas colorrectales se diagnostican inicialmente mediante una evaluación histológica que se realiza sobre muestras de tejido de biopsia, endoscópica o polipectomía. La gran mayoría de las neoplasias de colon y recto son carcinomas. De los carcinomas, más del 90 por ciento son adenocarcinomas que se originan a partir de células epiteliales de la mucosa colorrectal<sup>33</sup>.

Desde el punto de vista histológico, la Organización Mundial de la Salud considera las siguientes variantes histológicas para carcinomas de colon y recto: adenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma de células pequeñas, carcinoma medular, carcinoma indiferenciado y carcinoma neuroendocrino; siendo más frecuente el adenocarcinoma y clasificándose estos a su vez de acuerdo al grado de diferenciación en tumores bien, moderado o poco diferenciados<sup>34</sup>.

El adenocarcinoma convencional se caracteriza por la formación glandular, que es la base para la clasificación histológica del tumor. En el adenocarcinoma bien diferenciado, >95% del tumor forma glándulas. El adenocarcinoma moderadamente

diferenciado muestra 50-95% de formación de glándulas. El adenocarcinoma pobremente diferenciado es en su mayoría sólido con <50% de formación de glándulas. En la práctica, la mayoría de los adenocarcinomas colorrectales (~70%) se diagnostican como moderadamente diferenciados. Los carcinomas bien y mal diferenciados representan el 10% y el 20%, respectivamente. Un sistema de clasificación de 2 niveles, que combina bien y moderadamente diferenciado con bajo grado (50 % de formación de glándulas) y define pobremente diferenciado como de alto grado (<50 % de formación de glándulas), reduce la variación entre observadores y mejora la importancia pronóstica<sup>35,36</sup>.

En lo que respecta a la distribución anatómica del CCR, se diferencia entre el CCR del colon derecho e izquierdo. Esta distinción entre el colon del lado derecho y el del lado izquierdo se basa en sus orígenes embriológicos. El ciego, el apéndice, el colon ascendente, el ángulo hepático y los dos tercios proximales del colon transversal se originaron en el intestino medio, mientras que el tercio distal del colon transversal, el ángulo esplénico, el colon sigmoideo, el colon descendente y el recto se originaron en el intestino posterior. Por lo tanto, los tumores de CCR del lado derecho y los dos tercios proximales del colon transversal surgen del colon ascendente y los tumores de CCR del lado izquierdo surgen del colon descendente y sigmoideo, y un tercio distal del colon transversal<sup>37,38</sup>.

Además de la diferencia en su origen, estos tumores presentan una histología diferente. Mientras que los tumores del lado derecho muestran adenomas serrados sésiles o adenocarcinomas mucinosos, los tumores del lado izquierdo muestran adenocarcinomas tubulares, vellosos y típicos<sup>39</sup>. Dado que los tumores del lado izquierdo tienen morfología polipoide, es más fácil detectarlos con colonoscopia en las primeras etapas de la carcinogénesis. El CCR del lado derecho tiene una morfología plana que es difícil de detectar<sup>40,41</sup>. Los pacientes con CCR del lado derecho tienden a tener tumores avanzados y más grandes, que a menudo están pobremente diferenciados.

Se ha observado a nivel internacional un cambio hacia el lado derecho o proximal de CCR<sup>42</sup>.

Este cambio en la distribución puede deberse entre otros factores a que la colonoscopia es más eficaz en la prevención del CCR en el lado izquierdo que en el lado derecho, y puede estar relacionado también con mejoras en el diagnóstico y tratamiento, mientras que los pacientes con cáncer de colon izquierdo suelen sufrir desde el principio rectorragias o sangrado anal, y dolores tipo cólico que advierten de la presencia de la enfermedad, los pacientes con cáncer de colon derecho no sufren estos síntomas hasta que el tumor no está en un estadio mucho más avanzado, lo que conlleva a una detección más temprana y a una mayor proyección con la extirpación de pólipos adenomatosos en el colon distal.

Se ha observado que los adenomas, que son más planos y más difíciles de visualizar endoscópicamente y que característicamente tienen mutaciones BRAF, son más comunes en el colon derecho<sup>43,44</sup>.

La composición genómica de CCR derecho e izquierdo es totalmente diferente entre sí<sup>45</sup>.

Debido a todas estas diferencias están comenzando a tratarse casi como dos entidades clínicas diferentes, pues difieren en prevalencia, sintomatología, pronóstico y tratamiento.

### 1.1.4 Patrones de Crecimiento y Estadificación

La determinación del estadio del cáncer en función de su extensión anatómica (estadificación), es fundamental no sólo para estimar el pronóstico sino para definir las distintas alternativas terapéuticas. La estadificación tumoral utiliza tres parámetros: el tamaño tumoral, la infiltración de los nódulos linfáticos y la presencia o no de metástasis (Tumor/Nódulos/Metástasis –TNM).

<b>Tumor Primario (T)</b>	
<b>Tx</b>	Tumor primario no evaluable
<b>T0</b>	Sin evidencia de tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: Intraepitelial o invasión de lámina propia
<b>T1</b>	El tumor invade la submucosa
<b>T2</b>	El tumor invade la muscular propia
<b>T3</b>	El tumor invade más allá de la muscular propia hasta tejidos pericólicas
<b>T4a</b>	El tumor penetra en la superficie del peritoneo visceral
<b>T4b</b>	El tumor invade directamente otras estructuras y órganos vecinos
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
<b>Nx</b>	No se pueden evaluar los ganglios
<b>N0</b>	No hay indicios de metástasis en ganglios linfáticos
<b>N1</b>	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos
	N1a. Metástasis en un único ganglio regional
	N1b. Metástasis en 2-3 ganglios N1c. Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirrectales no peritonealizados sin afectación ganglionar locorregional.
<b>N2</b>	Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos
	N2a. Metástasis en 4-6 ganglios N2b. Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos.
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia
	M1a. Metástasis confinadas a un único órgano
	M1b. Metástasis en más de un órgano o en Peritoneo M1c. Metástasis aislada en la superficie peritoneal sin otra localización u órgano afecto.

**Tabla 1.1. Clasificación TNM para carcinoma colorrectal (8ª edición de la AJCC)<sup>46</sup>.**

La estadificación puede realizarse en diferentes momentos del proceso diagnóstico-terapéutico: preoperatoria, antes de tratamiento (estadificación clínica, cTNM), después del tratamiento quirúrgico (estadificación patológica o postquirúrgica, pTNM), después o durante el tratamiento de inducción, post quimio radioterapia y (estadificación yTNM), en el momento de la recidiva tumoral después de un intervalo libre de enfermedad (estadificación rTNM) o en la autopsia (estadificación aTNM) <sup>47</sup>.

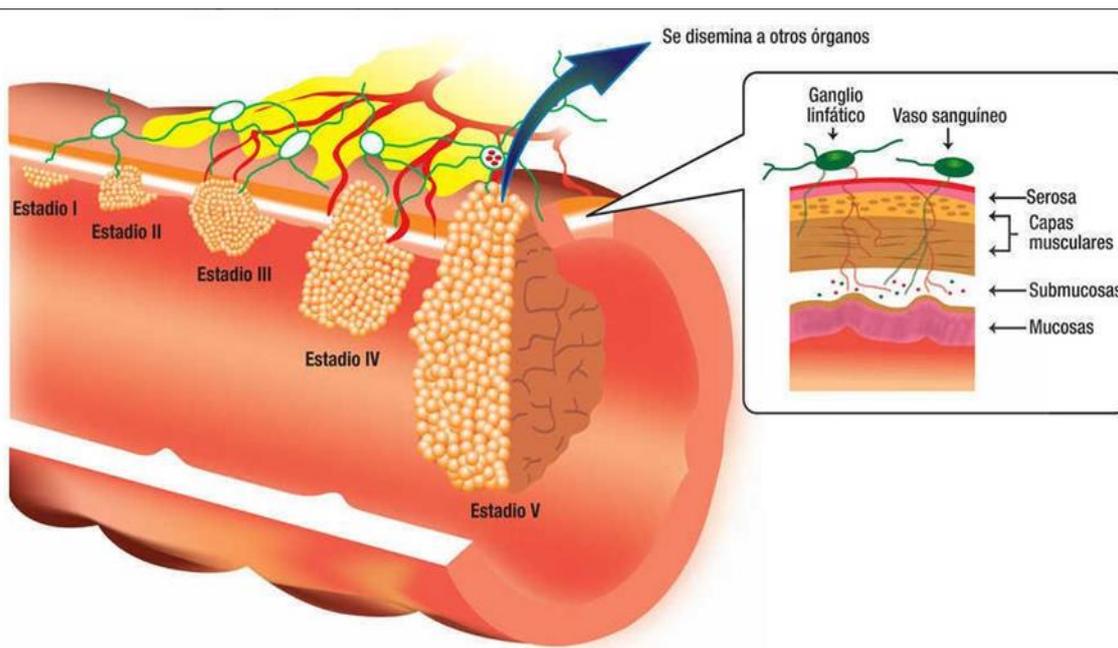


Fig.1.8 Clasificación por estadios del CCR en función del sistema TNM<sup>48</sup>

#### Agrupación de los estadios del cáncer<sup>49</sup>:

**Estadio 0:** se denomina cáncer in situ. Las células cancerosas se encuentran solo en la mucosa, o revestimiento interno, del colon o el recto.

**Estadio I:** el cáncer ha crecido, atravesado la mucosa e invadido la capa muscular del colon o el recto. No se ha diseminado a los tejidos cercanos o ganglios linfáticos (T1 o T2, N0, M0).

**Estadio IIA:** el cáncer ha crecido y atravesado la pared del colon o del recto, pero

no se ha diseminado a los tejidos o ganglios linfáticos cercanos (T3, N0, M0).

**Estadio IIB:** el cáncer ha crecido a través de las capas musculares hasta llegar al revestimiento del abdomen, denominado peritoneo visceral. No se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos ni a ninguna otra parte (T4a, N0, M0).

**Estadio IIC:** el tumor se ha diseminado a través de la pared del colon o del recto y ha invadido estructuras cercanas. No se ha diseminado a ganglios linfáticos cercanos ni a ninguna otra parte (T4b, N0, M0).

**Estadio IIIA:** el cáncer ha crecido a través del revestimiento interno o en las capas musculares del intestino. Se ha diseminado hacia 1 a 3 ganglios linfáticos, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon o el recto que no parecen ser ganglios linfáticos, pero no se ha diseminado hacia otras partes del cuerpo (T1 o T2, N1 o N1c, M0; o T1, N2a, M0).

**Estadio IIIB:** el cáncer ha crecido a través de la pared intestinal o en los órganos circundantes y en 1 a 3 ganglios linfáticos, o hacia un ganglio del tumor en tejidos que rodean el colon o el recto que no parecen ser ganglios linfáticos. No se ha diseminado a otras partes del cuerpo (T3 o T4a, N1 o N1c, M0; T2 o T3, N2a, M0; o T1 o T2, N2b, M0).

**Estadio IIIC:** independientemente de la profundidad con que se extendió el cáncer de colon, se ha diseminado a 4 o más ganglios linfáticos, pero no a otras partes distantes del cuerpo (T4a, N2a, M0; T3 o T4a, N2b, M0; o T4b, N1 o N2, M0).

**Estadio IVA:** el cáncer se ha diseminado a una sola parte distante del cuerpo, como el hígado o los pulmones (cualquier T, cualquier N, M1a).

**Estadio IVB:** el cáncer se ha diseminado a más de 1 parte del cuerpo (cualquier T, cualquier N, M1b).

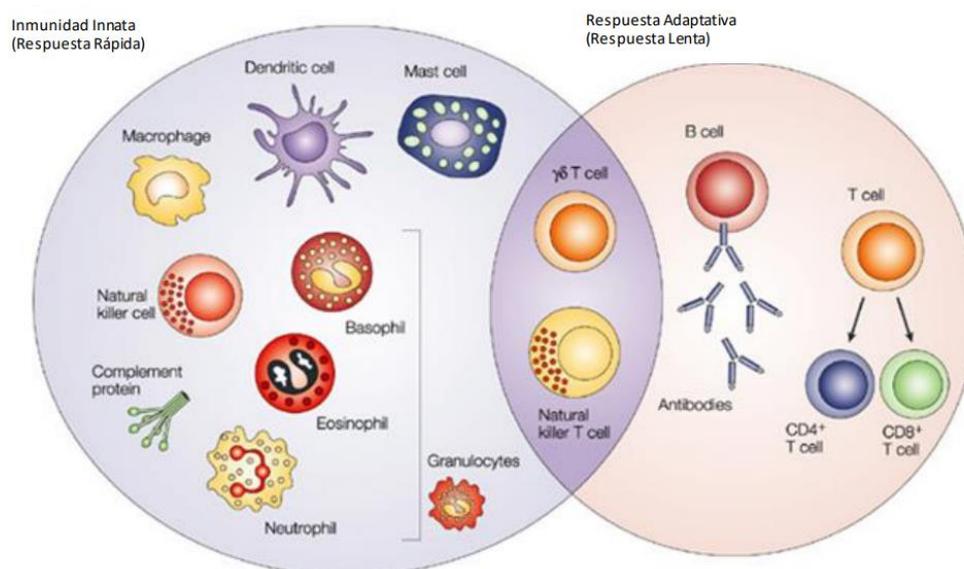
**Estadio IVC:** el cáncer se diseminó al peritoneo. También se pudo haber diseminado a otros lugares u órganos (cualquier T, cualquier N, M1c).

## 1.2. Inmunología y Cáncer

### 1.2.1 Mecanismos de evasión inmunológica de las células cancerosas

Existe una estrecha relación entre el desarrollo del cáncer y el sistema inmunológico, que juega un papel fundamental en la eliminación, así como en la progresión y mantenimiento del cáncer. El sistema inmunológico tiene por un lado la capacidad de detectar y destruir células cancerígenas, reconociendo antígenos tumorales sin afectar al tejido sano y crear memoria inmune frente a ellas. Sin embargo, la progresión maligna se acompaña de una profunda supresión inmune que impide una respuesta antitumoral efectiva y la eliminación del tumor, y puede propiciar un microambiente que favorezca el desarrollo del tumor.

El control y la prevención del crecimiento tumoral se basan en mecanismos de inmunovigilancia mediante respuestas inmunes innatas y adaptativas, que involucran macrófagos, células asesinas naturales, secreción de interleucinas como interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y linfocitos T citotóxicos CD8 (LTc), para eliminar las células transformadas. Sin embargo, la presión selectiva del microambiente tumoral en evolución puede alterar la respuesta inmune, permitiendo que las células transformadas sobrevivan sin ser detectadas a pesar de la presencia de células inmunes, apoyando la progresión hacia tumores sólidos. Así, aunque el sistema inmune puede generar una respuesta inmune a las células tumorales y eliminar el tumor, sigue habiendo una cierta proporción de tumores primarios que pueden metastatizarse y reaparecer, lo que se denomina evasión inmune del tumor.



**Fig.1.9. Tipos Celulares Implicados en la Respuesta Inmune, ya sea innata y/o adaptativa (Nature reviews, 2010).**

Se han propuesto varios mecanismos para escapar de la vigilancia inmune. Los mecanismos establecidos incluyen:

- Pérdida o alteración de antígenos específicos o maquinaria antigénica<sup>50-51</sup>. Los tumores pueden perder la expresión principal de MHC clase 1 o la maquinaria intracelular requerida para transportar antígenos tumorales a la superficie del tumor para el reconocimiento de células T<sup>52-53</sup>. Lo que implica pérdida de reconocimiento de células tumorales como anómalas, no produciéndose una respuesta inmunitaria adecuada, afectando significativamente a la capacidad de los linfocitos T citotóxicos CD8 para reconocer el tumor. La alteración de la expresión de los actores clave en el procesamiento de antígenos no solo afecta la expresión de MHC clase I, sino que también altera significativamente el repertorio de péptidos que se presentan. Estos repertorios de péptidos modificados pueden servir para reducir aún más la presentación de epítopos antigénicos específicos del tumor para ayudar a la evasión inmune y la progresión del tumor<sup>54</sup>.
- Los tumores tienen capacidad para modificar la regulación inmunitaria normal en su

beneficio. Pueden promover un microambiente tolerante a la inmunidad mediante la manipulación de citoquinas (aumento de la secreción de IL-6, IL-10 y TGF-beta, consumo de IL-2) que estimulan la infiltración de células Treg, células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs) y otros tipos de células que inhiben la función de las células T citotóxicas<sup>55-57</sup>. De modo que estas células pueden suprimir activamente la proliferación de linfocitos T CD4 + y CD8 + que de otro modo reconocerían antígenos tumorales. Todo ello lleva a la acumulación de poblaciones de células supresoras que inhiben en lugar de promover la inmunidad<sup>58</sup>.

- Los exosomas son vesículas encapsuladas a escala nanométrica que son liberadas por las células en el espacio extracelular y funcionan como vectores de señalización intercelulares a través de la transferencia horizontal de moléculas biológicas, incluidos los microARN (miARN). Existe evidencia de que los exosomas derivados del cáncer permiten que el tumor manipule su microambiente, lo que contribuye a la capacidad del tumor para la evasión inmune, el crecimiento, la invasión y la diseminación metastásica<sup>59</sup>.
- Se cree que las células cancerosas eluden la vigilancia inmune a través de la señalización PD-1 / PD-L1. Los tumores pueden regular al alza la expresión de moléculas de punto de control inmunitario como PD-1 y PD ligando 1 (PD-L1) que promueven el agotamiento de células T periféricas<sup>60</sup>.
- Las células asesinas naturales (NK) reconocen y eliminan eficazmente las células tumorales a través de varios mecanismos que incluyen la expresión de ligandos para receptores activadores de células NK en las células diana. Diferentes ensayos clínicos indican que la inmunoterapia basada en células NK representa un tratamiento antitumoral prometedor. Sin embargo, los tumores desarrollan estrategias de evasión inmune, incluida la regulación a la baja de ligandos para los receptores activadores de células NK, que pueden afectar negativamente a la actividad antitumoral de las células NK, que o bien residen endógenamente, o bien se transfieren adoptivamente.<sup>61</sup>

Estudios previos han indicado que el mecanismo de evasión inmune de las células de CCR puede separarse en 3 categorías principales:

1. Baja inmunogenicidad de las células del cáncer colorrectal, debido a una pérdida o baja expresión de moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA)<sup>62-63</sup> y una pérdida de la expresión del antígeno de apoptosis (Fas)<sup>64-65</sup>. La pérdida de la expresión de Fas tiene como consecuencia que no solo no transduce las señales de muerte para suprimir el desarrollo del tumor, sino que también activa la proliferación celular y el proceso de migración para promover el crecimiento y la progresión del tumor.

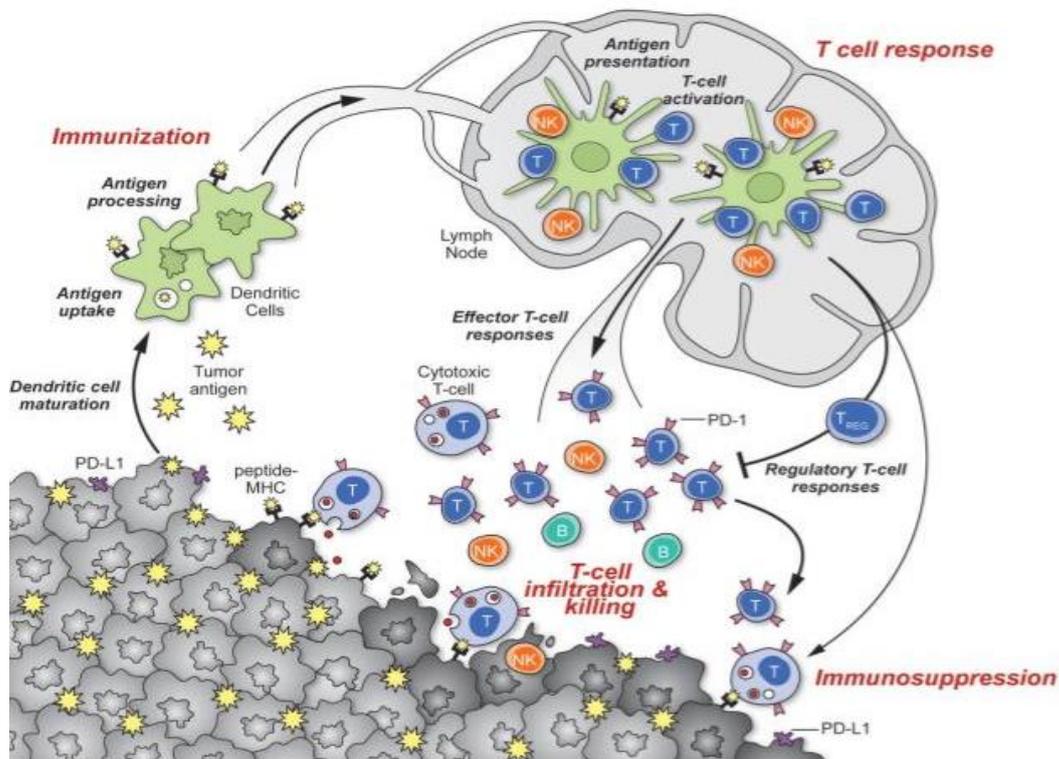
2. La señalización CCL5 / CCR5 (receptor quimiocina cc tipo 5) recluta Treg a los tumores y mejora su capacidad para eliminar las células T antitumorales CD8+, definiendo así un nuevo mecanismo de escape inmune en el cáncer colorrectal. Niveles más altos de expresión de CCL5 en células tumorales de colon humano se correlacionan con niveles más altos de apoptosis de células T CD8 +, lo que implica una disfunción de las células efectoras debido a altos niveles de expresión del CCR5 de las Treg infiltrantes tumorales<sup>66</sup>.

3. Las células cancerosas escapan de la muerte a través de trastornos de la vía Fas / FasL, que induce apoptosis, como hemos visto pierden o bajan la expresión del receptor FAS y además contraatacan induciendo la apoptosis de las células inmunitarias mediante la sobreexpresión del ligando Fas (FasL)<sup>67-69</sup>. Las células tumorales también evaden el sistema inmune mediante la sobreexpresión de receptores inhibitorios de los linfocitos T citotóxicos CD8+, HLA-E/ $\beta$ 2m y receptores inhibitorios de las células asesinas naturales (NK) por el receptor principal de HLA-E CD94/NKG2A<sup>70-71</sup>.

La investigación de los mecanismos de evasión inmune de las células tempranas de cáncer colorrectal y los ensayos de intervención de base inmunológica para el cáncer colorrectal temprano pueden generar datos para mejorar la eficacia de la inmunoterapia en este tipo de cáncer, basada en la idea de que el sistema inmunológico puede eliminar las células malignas durante la transformación inicial mediante un proceso denominado vigilancia inmunitaria<sup>72</sup>.

### 1.2.2 Células inmunes implicadas en la protección frente a tumores

Los tumores surgen a través de una combinación de cambios genéticos y epigenéticos que facilitan la inmortalidad de las células tumorales, pero al mismo tiempo crean antígenos extraños, los llamados neo-antígenos, que hacen que las células neoplásicas sean detectables por el sistema inmunológico y se pueda dirigir a ellas para su destrucción.



**Fig.1.10. Activación y regulación de la inmunidad antitumoral**<sup>73</sup>

Una respuesta inmune citotóxica eficiente y específica contra un tumor requiere una interacción compleja y de rápida evolución entre diversos tipos de células inmunes en el sistema inmune adaptativo e innato.

El sistema inmune es un sistema homeostático, que dispone de mecanismos de autorregulación, para prevenir una respuesta excesiva y lesivas con destrucción de células normales.

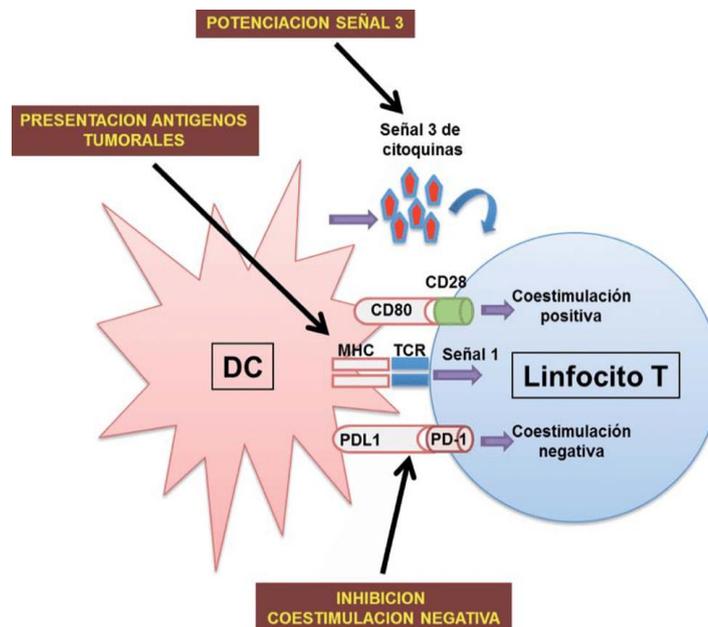
La respuesta inmunitaria antitumoral comienza con la captura de antígenos asociados al tumor por las células dendríticas. Las células dendríticas (CD) procesan el antígeno capturado para su presentación directa o presentación cruzada, mediante moléculas MHC clase I y clase II (respectivamente) y migran a los ganglios linfáticos drenantes. Estas células dendríticas provocarán respuestas de células T efectoras contra el cáncer en el ganglio linfático; si no se reconoce como extraño, inducirán en cambio tolerancia que conduzca a la delección de células T, la anergia o la producción de Tregs. En el ganglio linfático, la presentación del antígeno a las células T provocará respuestas dependiendo del tipo de estímulo recibido y de la interacción de las moléculas coestimuladoras de células T con sus receptores de superficie en las células dendríticas.

- Linfocitos T citotóxicos (LTc) CD8+ y subclases Th1/Th2 de linfocitos T colaboradores (LTh) CD4+. Los linfocitos CD8+ y CD4+ inician la distinción entre autoantígenos y los antígenos no propios, a través del reconocimiento en la "sinapsis inmune".

La sinapsis inmune, es una compleja estructura que se forma en la región de contacto entre una célula presentadora de antígeno (célula dendrítica, p. ej.) y una célula T, y tiene la capacidad de distinguir los autoantígenos frente a los no propios. En general, la actividad citotóxica de una célula T CD8+ está regulada por la presencia y orientación espacial de un conjunto de receptores estimulantes e inhibidores cuya expresión está regulada por una gran cantidad de citoquinas. En la figura 1.11. se muestra una célula dendrítica presentando un péptido antigénico unido a una molécula MHC al linfocito T de la derecha a través de su receptor de célula T (TCR). Esta presentación del péptido genera una señal en el linfocito (señal 1) que no es suficiente para activarlo. Para ello, es necesaria la unión de moléculas coestimuladoras/coinhibitorias presentes en la superficie de la CD con sus ligandos correspondientes en el linfocito T. En la figura se muestra una coestimulación positiva (CD80 con CD28) en la zona superior y una interacción coinhibitoria (PD-L1 con PD-1) como se muestra en la parte inferior. Además, la presencia de citoquinas secretadas durante la presentación de antígeno proporcionará una tercera señal al linfocito T para su activación y diferenciación. Para incrementar las

capacidades activadoras de las CDs, habría que potenciar ciertas señales de citoquinas, e inhibir interacciones inhibitorias<sup>74</sup>.

Así, en ausencia de la "segunda señal", que en las células T vírgenes es CD28, pero en las células T activadas puede ser OX40, CD137, etc., las células T pueden volverse anérgicas y no expresar una respuesta al antígeno.



**Fig.1.11 Sinapsis inmune<sup>74</sup>.**

Por lo tanto, la interacción de CD28 u OX40 con CD80/86 o OX40L promoverá respuestas potenciales de activación de las células T, mientras que la interacción de CTLA4 con CD80/86 o PD-1 con PD-L1 / PD-L2 suprimirá las respuestas de las células T y posiblemente promoverá la formación de Treg. Una vez activadas, las células T (junto con las células B y las células NK) saldrán del ganglio linfático y entrarán en el lecho tumoral, donde encontrarán una serie de mecanismos de defensa inmunosupresores que pueden ser producidos por el tumor que se oponen a la función de las células T efectoras.<sup>73</sup>

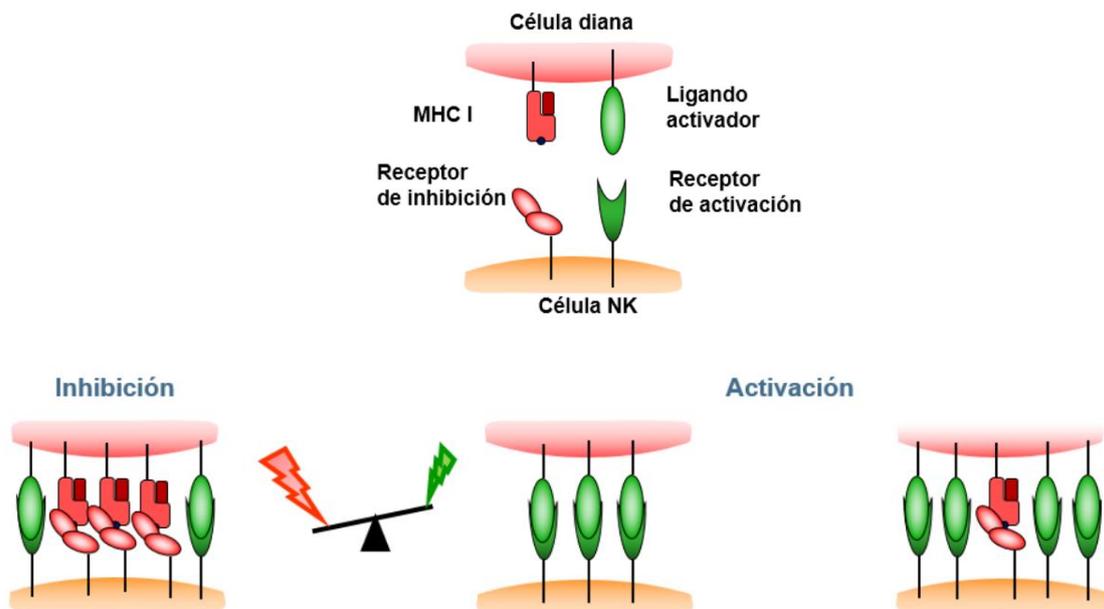
- Las células asesinas naturales (NK) son linfocitos innatos que reconocen y lisan las células tumorales sin activación previa. No requieren presentación de antígenos por parte del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para la actividad citotóxica.

Desencadenan una reacción espontánea desde el primer contacto con el antígeno. Ejercen una citotoxicidad directa sobre la célula tumoral, producen citoquinas que activan los linfocitos T, las células dendríticas y que promueven la maduración de los linfocitos B<sup>75</sup>.

Las células tumorales, generalmente, pierden o reducen la expresión de MHC clase I, como mecanismo de inmunoevasión, pero las células NK son capaces de detectar mediante sus receptores Ig-like (KIR) la ausencia de MHC clase I y destruir la célula tumoral.

De hecho, las células NK se dirigen a las células con baja expresión de MHC de clase I para su destrucción. Las moléculas MHC clase I (presentes en la mayoría de las células sanas del organismo) producen señales inhibitorias sobre las células NK, por ello las células tumorales en ausencia o baja expresión de MHC clase I (que escapan más fácilmente del control por parte de los linfocitos T) son susceptibles a las NK.<sup>76</sup>

El reconocimiento de las células diana por parte de las NK no se encuentra únicamente limitado a la detección de moléculas MHC clase I en la superficie de la célula diana, si no que se debe a un equilibrio entre las señales activadoras y las señales inhibitorias que proceden del amplio repertorio de receptores de la célula. Figura.1.12.



**Fig.1.12** Equilibrio entre señales activadoras e inhibitorias que determina si la célula NK atacará o no<sup>77</sup>.

Así, los receptores activadores transmiten señales que indican peligro al detectar una célula tumoral que expresa en su membrana los ligandos para estos receptores, mientras que los receptores inhibidores identifican las células propias y transmiten señales que indican tolerancia evitando así la autorreactividad. La señal predominante será la que determine la decisión final de la célula NK<sup>78</sup>. Existen tres principales familias de receptores en las células NK: los receptores de citotoxicidad natural (NCR), los receptores tipo lectina C y los receptores KIR. Mientras que la familia de los NCRs contiene únicamente receptores activadores, los receptores tipo lectina C y los KIRs incluyen tanto receptores activadores como inhibidores<sup>79</sup>.

Estas células generalmente se encuentran localizadas a lo largo de los márgenes invasivos del tumor y su número juega un papel importante para detenerlo.

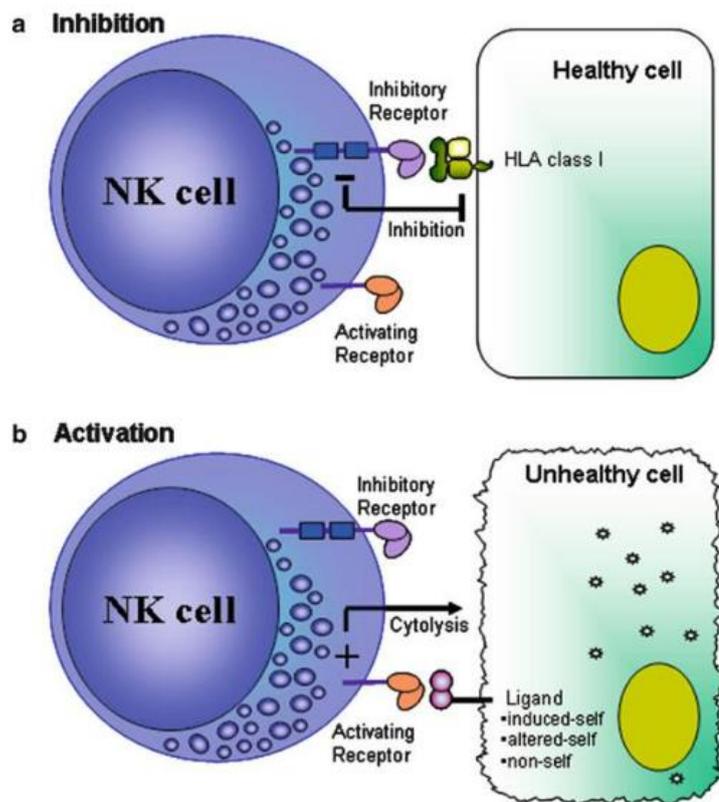


Fig.1.13 Receptores de activación e inhibición<sup>80</sup>.

- Los linfocitos T infiltrantes de tumor (TIL), están compuestos de linfocitos B, LTc CD8+, células NK y LTh CD4 localizados en los infiltrados inflamatorios presentes en los islotes tumorales y en el estroma peritumoral de los tumores sólidos, siendo las células T las más abundantes de los TIL. Estos son un mecanismo de defensa y su abundancia en los tejidos tumorales está relacionada con la supervivencia de los pacientes con cáncer ya que reconocen y eliminan específicamente las células tumorales.<sup>81</sup>

Su distribución no es aleatoria, sino que está bien organizada en áreas específicas.

Los TIL del estroma, como las células B y T, sirven como organizadores inmunitarios clave de los estímulos del microambiente tumoral (TME) a través de la secreción de citocinas. Una de las quimiocinas más relevantes y mejor caracterizadas en la organización estructural del grupo de células inmunitarias es CXCL13, que induce la quimiotaxis de las células B y las células T que expresan CXCR5 hacia el margen invasivo, donde se agrupan en estructuras bien organizadas como estructuras linfoides terciarias (TLS). Este margen invasivo representa la primera línea de defensa contra la metástasis del cáncer.<sup>82</sup>

- Los macrófagos, son un componente esencial en la inmunidad innata mediante la detección de señales de patógenos o daños en los tejidos. Asumen un papel regulador que comprende la reparación de tejidos, la regulación adaptativa del sistema inmune y funciones de control durante la migración de células inmunitarias y la inducción y regulación de la inflamación<sup>83</sup>.

Los macrófagos son células inmunes que son potentes efectoras, cuya plasticidad funcional conduce a la función antitumoral y protumoral en diferentes entornos.

Los macrófagos asociados a tumores o TAM se originan a partir de los monocitos circulantes o macrófagos residentes en el tejido. Constituyen el principal componente inflamatorio del estroma tumoral, siendo abundantes en todas las etapas de progresión del tumor. Se localizan dentro o cerca de la masa tumoral y tras su activación en base en las funciones proinflamatorias y antiinflamatorias de los macrófagos bajo diferentes estímulos, se ha propuesto una clasificación amplia, en la que los macrófagos se diferencian en al menos dos fenotipos diferentes:

Macrófagos M1 (polarización denominada activación clásica), proinflamatorios, activados por lipopolisacáridos (LPS) o interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) responsables de la fagocitosis, tienen como principal función la eliminación de patógenos y células cancerígenas, ejerciendo una fuerte respuesta inflamatoria mediante la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Este subtipo favorece la inhibición del crecimiento tumoral.

Macrófagos M2 (activación alternativa) activados por mediadores antiinflamatorios como IL-4, IL-10, IL-13, promoviendo la reparación del daño, y suprimiendo la respuesta inmune. Se encarga de la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante). Poseen capacidades promotoras de crecimiento tumoral, amortiguan las respuestas inflamatorias y fomentan la tolerancia<sup>84</sup>.

Se ha descrito que los TAM pueden cambiar entre los subtipos M1 y M2 dependiendo de los estímulos del microambiente tumoral (TME)<sup>85</sup>. Esta capacidad se conoce como la plasticidad de los macrófagos.

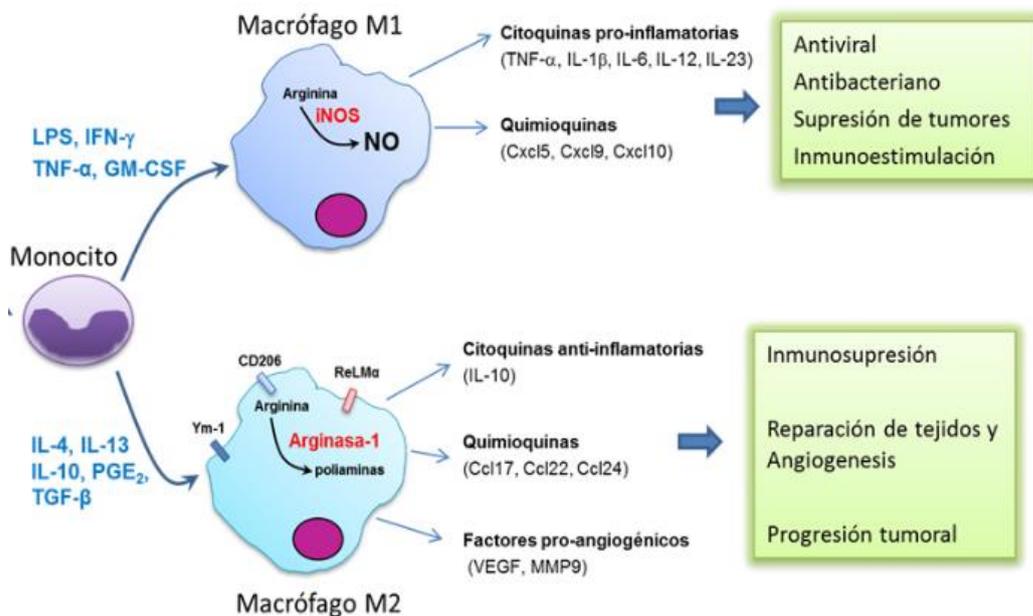


Fig.1.14. Diferentes estados de activación de los macrófagos<sup>86</sup>.

### 1.2.3 El linfocito T

Los linfocitos T son fundamentales en las respuestas inmunitarias protectoras frente a patógenos y tumores, tienen la capacidad de generar receptores capaces de reconocer prácticamente cualquier patógeno, siendo fundamental tanto en la respuesta adaptativa como en la innata.

La molécula de membrana característica de los linfocitos T maduros es su receptor para antígeno, receptor de antígenos de células T (TCR), el cual interactúa con el antígeno para la posterior activación del linfocito y sus correspondientes acciones efectoras.

Actualmente se conocen dos poblaciones de LT que se diferencian en su receptor de antígeno de membrana, receptor de antígenos de células T (TCR).

- $LT\alpha\beta$ , que expresan el receptor para antígeno  $TCR-\alpha\beta$ . Son los más frecuentes en sangre periférica (entre un 90 y un 95%), bazo y ganglios linfáticos, mediando respuestas inmunes específicas. Reconocen péptidos antigénicos procesados previamente y unidos al MHC en la membrana de una CPA.

- $LT\gamma\delta$  que expresan el receptor para antígeno  $TCR-\gamma\delta$ . Constituyen sólo una pequeña proporción (1-5%) de los linfocitos circulantes y en los órganos linfoides secundarios, encontrándose fundamentalmente en los epitelios, donde pueden constituir hasta el 50% de los linfocitos intraepiteliales (LIE) en la mucosa (10-20% en el epitelio genitourinario, 40-50% en el intestinal y hasta el 60% de las células T en la dermis).<sup>87,88</sup>

Tienen mayor variedad desde el punto de vista del reconocimiento antigénico:

- Primero reconocen proteínas directamente sin el procesamiento antigénico previo por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)<sup>89</sup>.

- La segunda es que no reconocen (o sólo raramente) péptidos procesados por las CPA, más bien reconocen metabolitos microbianos fosforilados y péptidos lipídicos<sup>90</sup>.

- La tercera reconocen ligandos no peptídicos<sup>91</sup> y superantígenos bacterianos<sup>92</sup>.

Así pues, la falta de necesidad de procesamiento del antígeno permite a los linfocitos T  $\gamma\delta$  una respuesta rápida, y por su variedad en los modos de reconocimiento, una respuesta amplia; por lo que se le atribuye un importante papel en la inmunidad innata o inespecífica.

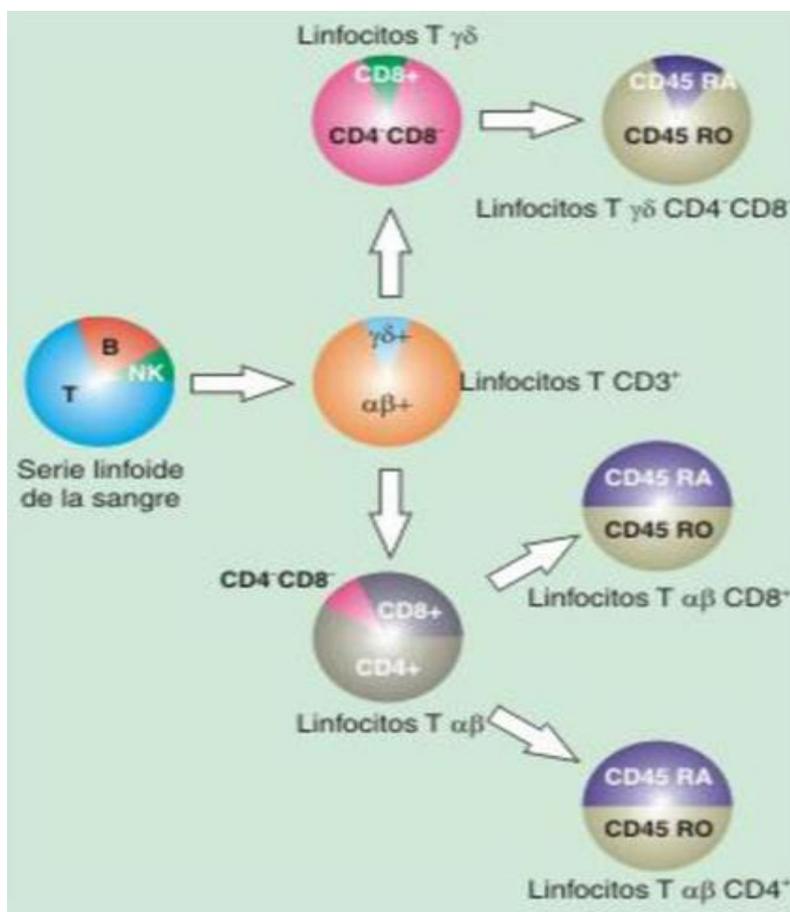
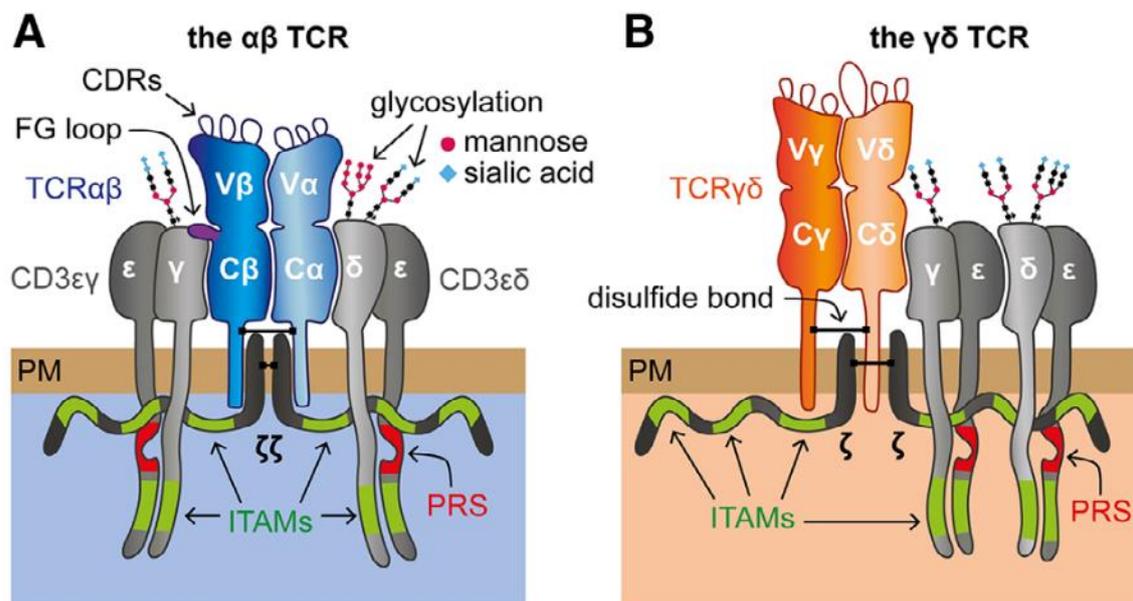


Fig.1.15. Proporciones relativas de linfocitos T y de sus tipos y subtipos en sangre humana<sup>93</sup>.

### 1.2.3.1 Estructura de los TCR

Las cadenas peptídicas del TCR,  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ , están formadas por heterodímeros unidos covalentemente por puentes disulfuro, y son responsables del reconocimiento antigénico. Estas cadenas tienen un dominio constante (C) y un dominio variable (V), en la parte más distal de la porción extracelular. Las regiones variables de cada una de estas

cadenas están encargadas del reconocimiento antigénico. Estas regiones contienen 3 tramos cortos de secuencias hipervariables<sup>94</sup> denominadas «regiones determinantes de complementariedad» (CDR). Hay un total de 6 CDR por receptor. La diversidad en el TCR se limita predominantemente a estos seis bucles de horquilla hipervariables en los dominios variables<sup>95</sup>, que son los encargados del reconocimiento de péptidos antigénicos y son diferentes en cada clon de linfocitos T, siendo el dominio extracelular el responsable de la especificidad del TCR.

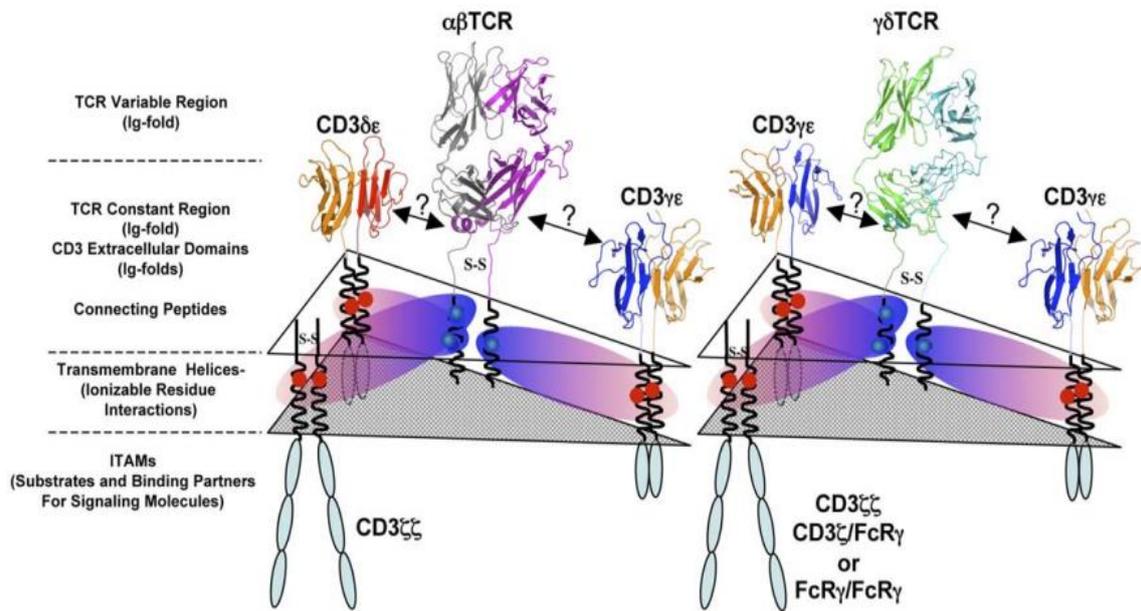


**Fig.1.16.** Estructura de los complejos TCR  $\alpha\beta$  (A) y TCR  $\gamma\delta$  (B), donde vemos la región variable (V) con las CDR (región hipervariable) que forman el sitio de unión del Ag y la región constante (C)<sup>96</sup>.

A su vez estos heterodímeros que están unidos mediante enlaces no covalentes al complejo CD3, presente en todos los linfocitos T, son invariables, mediando la transducción de señales en la célula.

El complejo CD3 está compuesto por tres monómeros denominados  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  unidos espacialmente, pero no con carácter covalente. La cuarta cadena invariable la constituye la cadena  $\zeta$  (zeta), que se asocia al complejo TCR/CD3 en forma de dímeros  $\zeta\zeta$  unidos covalentemente. Estas cuatro cadenas invariables son necesarias para la

señalización intracelular. Transmiten la información al interior celular a través de sus motivos con tirosinas (ITAM).



**Fig.1.17.** Estructura de los complejos TCR  $\alpha\beta$  (izquierda) y TCR  $\gamma\delta$  (derecha), que muestra la región extracelular, transmembrana e intracelular<sup>97</sup>.

Las cuatro cadenas variables TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$ , TCR $\delta$ , que se emparejan entre sí para dar lugar a los dos tipos de receptores TCR $\alpha\beta$  y TCR $\gamma\delta$  vienen determinadas por distintas combinaciones génicas de los segmentos V (variable), D (diversidad) y J (joining)<sup>98</sup>.

Los segmentos V, D y J se reordenan a nivel génico durante el desarrollo de los linfocitos mediante un proceso denominado «recombinación V(D)J». Este proceso permite la generación de un enorme repertorio de receptores para antígenos distintos en linfocitos T.

Los reordenamientos clonales que se producen entre los segmentos V, J y D, junto a las hipermutaciones somáticas de la región hipervariable del segmento V durante su ontogenia, permiten un reconocimiento casi infinito de antígenos<sup>96</sup>.

### 1.2.3.2 Desarrollo y diferenciación de los LT

La linfopoyesis, que es la producción de nuevos linfocitos, tiene lugar en los órganos linfoides primarios, en el caso de los LT en el timo, donde se lleva a cabo un proceso de maduración de los linfocitos a partir de un precursor linfoide generado en la médula ósea. Durante el proceso de maduración en el timo los LT en desarrollo se denominan timocitos donde sufren una serie de procesos de maduración que pueden identificarse en función de la expresión de distintos marcadores de superficie.

La mayoría de las células en el timo dan lugar a células T  $\alpha\beta$ , aunque en torno a un 5% llevarán el TCR  $\gamma\delta$ .

En el primer estadio de maduración, las células T no tienen expresión en su membrana de los receptores CD4 y CD8 (estadio conocido como doble negativo, DN).

Esta población puede ser subdividida en función de la expresión de CD44 y CD25 como se puede observar en la figura 1.18.

Las siguientes etapas de maduración de DN1 a DN4 se clasificarán en función de la expresión en superficie de los receptores CD44 (una molécula de adhesión) y CD25 (la cadena  $\alpha$  del receptor de la interleucina-2), como se puede observar en la figura 1.18: DN1 (CD25-CD44+), DN2 (CD25+CD44+), DN3 (CD25+CD44-) y DN4 (CD25-CD44-)<sup>99,100</sup>.



**Fig.1.18. Desarrollo de células T  $\alpha\beta$ , mostrando los distintos marcadores de superficie expresados en las distintas etapas del desarrollo<sup>101</sup>.**

Los timocitos DN1 son las células que acaban de migrar al timo desde la médula ósea y, por tanto, portan los reordenamientos DH-JH del gen IGH que ocurrieron anteriormente. Durante los estadios DN2 y DN3 se producen los reordenamientos de los genes  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , permitiendo la formación de las cadenas TCR funcionales que dan lugar, en la fase final de DN3 a dos programas de desarrollo diferenciados que permitirán la generación de dos subgrupos de LT con características y funciones diferenciadas: un LT $\gamma\delta$  maduro y un linfocito pre-TCR portador de la cadena  $\beta$ <sup>102</sup>. El pre-TCR consiste en una cadena TCR $\beta$  y una cadena invariable denominada pre-T $\alpha$ , asociadas a los dímeros de las cadenas invariables CD3<sup>103</sup>.

Aquellas células incapaces de expresar una cadena  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$  funcional serán desechadas.

La señalización pre-TCR en DN3 desencadena una maduración de timocitos dobles negativos a timocitos dobles positivos (CD4+CD8+). Ya en el estadio DN4 se detecta reordenamiento de la cadena  $\alpha$  permitiendo la formación de T $\alpha\beta$  CD4 o T $\alpha\beta$  CD8 que migran fuera del timo como LT $\alpha\beta$  maduros, que serán clasificados como LTh (T $\alpha\beta$  CD4) o linfocitos citotóxicos (T $\alpha\beta$  CD8)<sup>104</sup>.

### 1.2.3.3 El Linfocito T $\alpha\beta$ y Linfocito T $\gamma\delta$

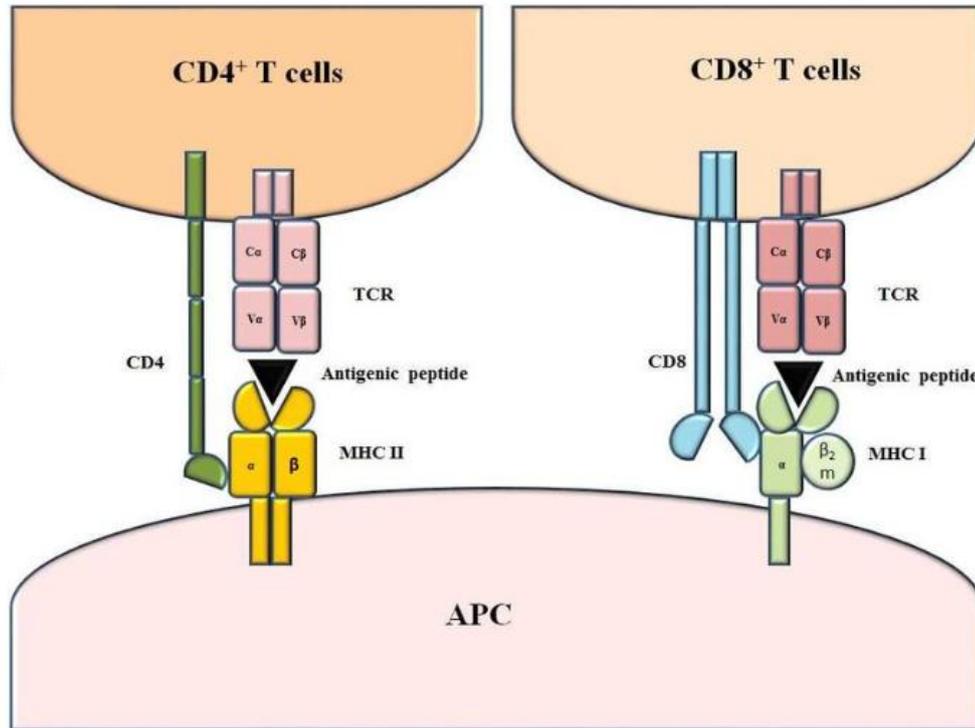
El complejo TCR/CD3 es característico de los linfocitos T, y los divide en dos grandes subpoblaciones LT $\alpha\beta$  y LT $\gamma\delta$ , que expresan el TCR- $\alpha\beta$  y el TCR- $\gamma\delta$  respectivamente.

1.- Los LT $\alpha\beta$  surgen de células madre hematopoyéticas CD34+ que adquieren expresión de CD2, CD5 y CD7 durante la linfopoyesis. Después de la migración de la médula ósea al timo, se expresa CD3.

Las células T precursoras expresan CD3 en niveles bajos en su superficie y pasan por una transición rápida, donde primero se adquiere la expresión de CD8 y luego de CD4<sup>105</sup>.

Los LT $\alpha\beta$  en sangre periférica pueden subdividirse en dos grandes subtipos, excluyentes entre sí, atendiendo a la expresión de los antígenos de superficie CD4 y CD8. El papel biológico de cada uno de ellos es completamente distinto, como lo es su manera de reconocer péptidos antigénicos.

CD4 y CD8 son glicoproteínas que sirven como co-receptores para ayudar al reconocimiento del antígeno presentado en MHC-II y MHC-I respectivamente<sup>106</sup>.



**Fig.1.19. Estructura de los complejos MHC-peptido-TCR<sup>107</sup>.**

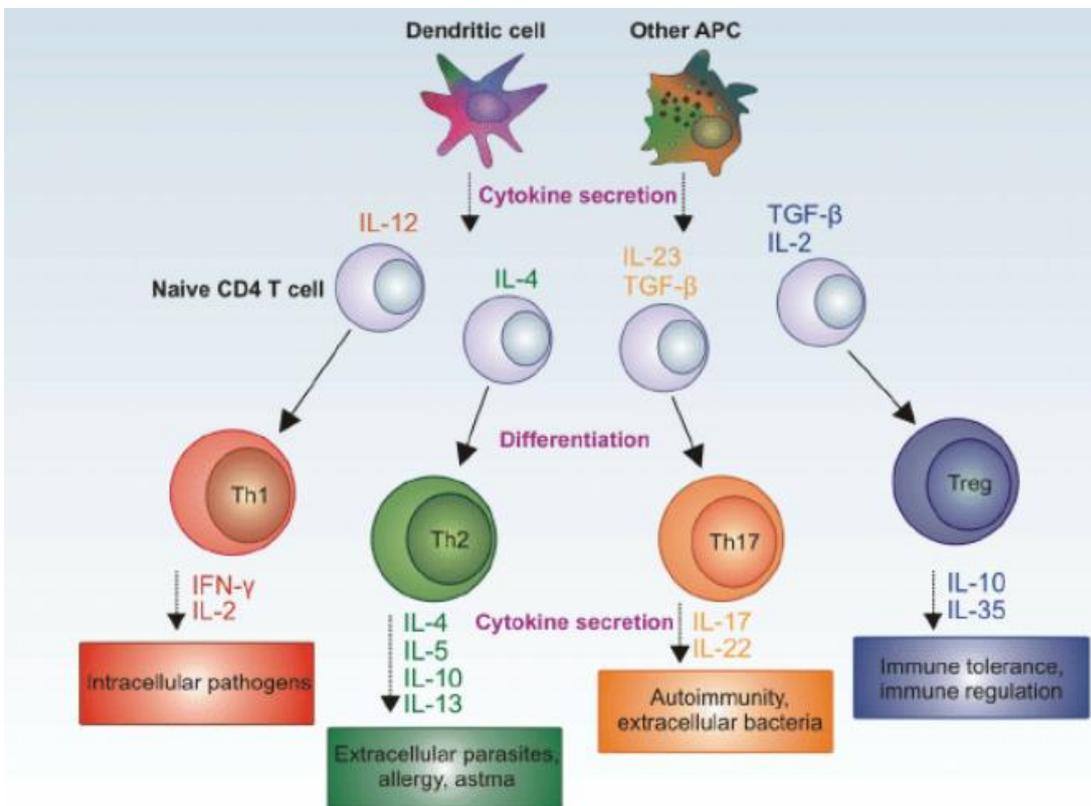
Como vemos en la figura 1.19 el antígeno CD8 es requerido para la interacción de la célula T con las moléculas expresadas por los genes del MHC clase I en todas las células nucleadas, mientras que el antígeno CD4 es necesario para la interacción con células que expresan moléculas del MHC clase II, que solo expresan las células presentadoras de antígenos (CPA) como las células dendríticas, los fagocitos como los macrófagos, y las células B.

Para la activación de los linfocitos, además de las señales mediadas por el complejo TCR/CD3, se necesitan otras señales mediadas por moléculas coestimuladoras y/o citocinas.

Una vez activados los linfocitos TCD4 se convertirán en linfocitos T cooperadores (LTh, del inglés helper). Son esenciales para la existencia de ambas vías del sistema inmunitario, la inmunidad adaptativa, ya que regulan a las células B para que produzcan anticuerpos, así como a los linfocitos citotóxicos, reclutan otras células de la

inmunidad innata para llevarlas a los sitios de infección, inducen a los macrófagos a incrementar su actividad microbicida y liberan citocinas para orquestar su respuesta<sup>108</sup>.

Las células CD4+ vírgenes pueden inducirse y diferenciarse en varios subtipos de LTh, determinadas por las señales que reciben durante su interacción inicial con el antígeno, así como la acción de citocinas en el medio en que se encuentran. Se han clasificado principalmente cuatro poblaciones mayoritarias claramente definidas en función de las citocinas que producen y de su actividad predominante: Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras (Treg)<sup>109</sup>.



**Fig.1.20. Diferenciación de los LTh vírgenes en Th1, Th2, Th17 y Treg y sus principales funciones<sup>110</sup>.**

Las Th1 son altamente efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares, son secretoras de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2), su factor de diferenciación es la IL-12.

Las Th2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos<sup>111</sup>. Liberan IL-4, IL5 e IL-13, y su factor de diferenciación es la IL4<sup>112</sup>.

Las células Th17 se caracterizan por producir IL-17. Desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa<sup>113</sup>.

Las Treg son las encargadas de mantener la homeostasis inmune al suprimir la respuesta inmune y manteniendo la tolerancia de los LT ante los antígenos propios. Su factor de diferenciación es el factor de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ) y se propagan gracias a la interleucina 2 (IL-2)<sup>114</sup>.

Cuando los LTCD8 son activados se convierten en LTc, son una importante herramienta contra patógenos intracelulares, como bacterias o virus, y para la vigilancia de las células tumorales. Una vez que la célula T CD8+ ha reconocido su antígeno y se ha activado, posee tres mecanismos para eliminar las células infectadas o malignas.

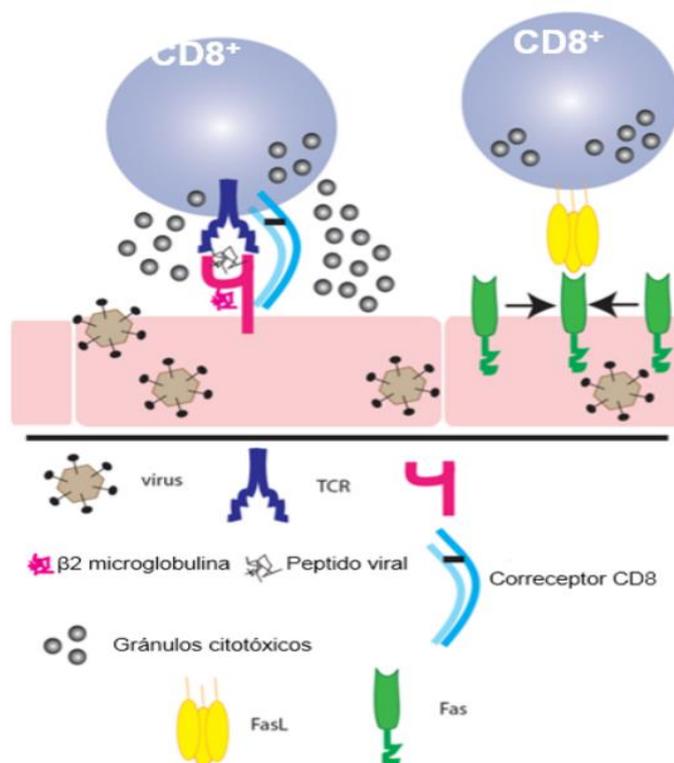


Fig.1.21. Interacción entre un linfocito CD8+ y una CPA<sup>115</sup>.

- La primera es a través de la secreción de citocinas, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , con efectos antitumorales y antimicrobianos.

- La segunda función es la producción y liberación de gránulos citotóxicos. contienen dos familias de proteínas, perforinas y granzimas. Las perforinas forman un poro en la membrana de la célula diana que permite que las granzimas entren en las células infectadas o malignas. Las granzimas son proteasas de serina que procesan las proteínas en el interior celular, bloqueando la producción de proteínas virales y, finalmente, provocando la apoptosis de la célula diana.

- La tercera modalidad de destrucción es vía interacción de Fas/FasL. Las células T CD8+ activadas expresan FasL en su superficie, lo que permite la unión a su receptor, Fas, que se expresa en la superficie de las células diana. Esta unión provoca una cascada de señalización que promueve la activación de caspasas, lo que trae consigo la apoptosis de la célula<sup>115</sup>.

2.- La característica definitoria del subconjunto de los LT $\gamma\delta$  es su receptor de células T específico TCR $\gamma\delta$ , compuesto por una cadena  $\gamma$  y una cadena  $\delta$ .

Los LT $\gamma\delta$ , como el resto de células sanguíneas, derivan de células madre hematopoyéticas pluripotenciales, como el resto de linfocitos T, maduran y se diferencian en el timo. Los timocitos comprometidos con el linaje  $\gamma\delta$  darán lugar fundamentalmente a LT $\gamma\delta$  dobles negativos para CD4 y CD8. Posteriormente, los LT $\gamma\delta$  maduros deberán abandonar el timo y dirigirse a los tejidos periféricos, fundamentalmente al intestino, con lo que representan un bajo porcentaje de los linfocitos T en sangre periférica entre el 1 y el 5%, de los que aproximadamente un 70% son dobles negativos para CD4CD8 y tan solo un 30% es CD8+<sup>116</sup>.

Preferentemente se encuentran en epitelios y mucosas, dónde se piensa que actúan como primera línea de defensa frente a patógenos. Son un conjunto único, descubierto en la década de los 80, y que se encuentra a caballo entre la inmunidad innata y adquirida, y han demostrado ser imprescindibles para la defensa de nuestro organismo frente a

infecciones y tumores, ya que su función principal puede ser ampliar la respuesta inmunitaria<sup>117</sup>.

Son actores claves en la vigilancia inmune, debido al rápido reconocimiento de células infectadas y estresadas, y a que no se limitan al reconocimiento de péptidos presentados por proteínas MHC, gracias a sus características únicas relacionadas con su capacidad de respuesta rápida contra agentes microbianos en la primera línea de defensa mediante el reconocimiento de fosfoantígenos, lípidos y proteínas no procesadas por el MHC<sup>118</sup>.

Los  $LT\gamma\delta$  muestran una amplia plasticidad funcional tras reconocer células infectadas o transformadas, como vemos en la figura 1.22.

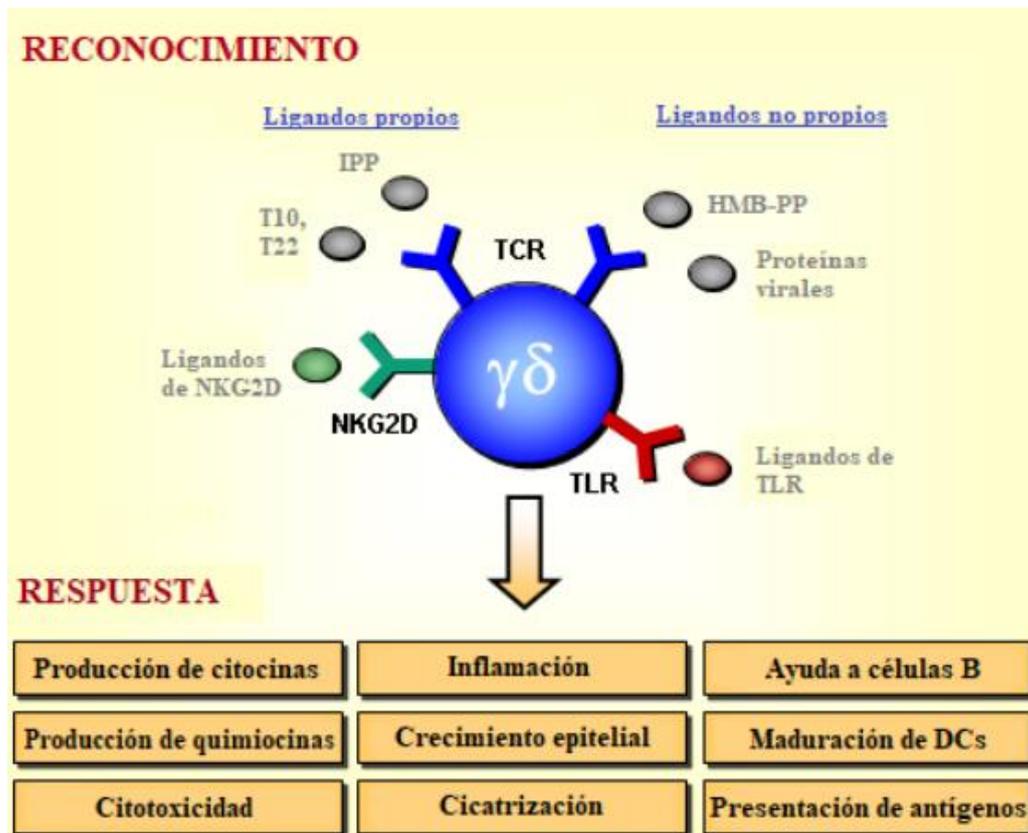


Fig.1.22. Plasticidad funcional de los  $LT\gamma\delta$ <sup>119</sup>.

- Produciendo citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17) y quimiocinas (CCL5, IP-10, linfotactina) que son mediadores químicos que aumentan la función de otras células inmunes, tanto local como sistemáticamente.
- Lisando las células infectadas o transformadas (perforinas, granzimas, TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)).
- Interaccionando con otras células como células epiteliales, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y células B.
- Son capaces de presentar antígenos exógenos, como células profesionales presentadoras de antígeno, en las moléculas de MHC-II a las células LTh o en las moléculas de MHC-I a células LTc.
- Poseen una capacidad inherente para atacar y destruir las células cancerosas e infectadas, pudiendo distinguir células cancerosas de células sanas mediante la detección de señales de estrés específicamente expresadas por células cancerosas. Un ejemplo de éstas, son un grupo de moléculas pequeñas denominadas colectivamente fosfoantígenos que están específicamente sobreproducidas por las células transformadas. Los LT- $\gamma\delta$  pueden detectar esta sobreproducción, activarse y eliminar las células cancerosas.
- En algunas infecciones, se produce una expansión clonal de células T  $\gamma\delta$  periféricas que tienen TCRs específicos, lo cual indica la naturaleza adaptativa de la respuesta inmunitaria mediada por estas células<sup>119</sup>.

### 1.3. La apoptosis

En los organismos multicelulares, la homeostasis del número de células se mantiene a través de un balance entre la proliferación y la muerte celular. Un patrón anormal de muerte celular se va a correlacionar con la aparición de diferentes condiciones patológicas<sup>120</sup>.

Antes se creía que la muerte celular era el resultado de uno de dos procesos distintos, apoptosis (también conocida como muerte celular programada) o necrosis (muerte celular descontrolada); en los últimos años, sin embargo, se han descubierto otras formas de muerte celular que destacan que una célula puede morir a través de varias vías diferentes: apoptosis, necrosis, oncosis, piroptosis y la autofagia.

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos característicos en la estructura de la célula, junto con una serie de procesos bioquímicos dependientes de enzimas. El resultado es la eliminación de células del cuerpo para mantener un equilibrio fisiológico adecuado, con un daño mínimo a los tejidos circundantes.

La necrosis, sin embargo, se caracteriza generalmente por ser la muerte incontrolada de la célula, normalmente después de una lesión grave, que da como resultado el derrame del contenido de la célula en los tejidos circundantes y el daño subsiguiente de los mismos.

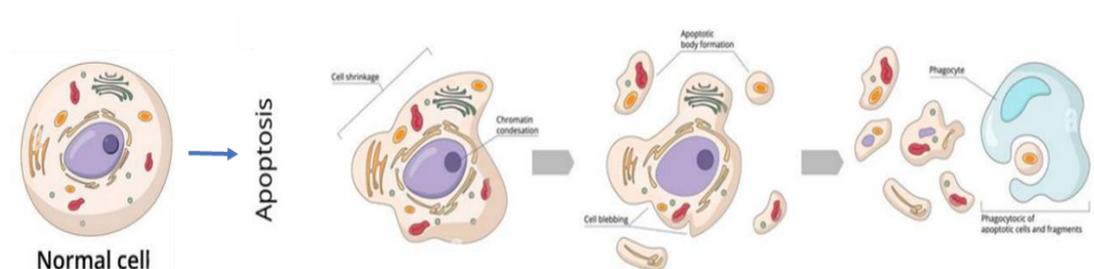
Recientemente ha quedado claro que existe una serie de subtipos de apoptosis y que existe una superposición entre la apoptosis, la necrosis y la autofagia, que bajo ciertas circunstancias pueden tener efectos sinérgicos<sup>121</sup>.

La apoptosis tiene un papel crucial en los organismos pluricelulares, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento y como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones de células en los tejidos. La apoptosis también ocurre como un mecanismo de defensa, como en las reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos<sup>122</sup>.

Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios bioquímicos y morfológicos.

Durante la apoptosis, las células disminuyen su tamaño, originando una pérdida de adherencia y de los contactos con las células vecinas y se produce un aumento brusco de la densidad intracelular. El retículo endoplasmático se dilata, formando vesículas y fusionándose con la membrana plasmática, eliminando así su contenido al medio extracelular. Esta rápida, pero selectiva, salida de fluidos e iones intracelulares se

encuentra mediada por transportadores iónicos (cotransportador cloro-potasio-sodio, que inhibe la pérdida de agua y sodio de las células afectadas).



**Fig.1.23. Cambios morfológicos que caracterizan a una célula en apoptosis<sup>123</sup>.**

Se produce un incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre en el citoplasma ( $[Ca^{+2}]$ ), diferencia clara frente a los procesos de necrosis, donde su aumento es drástico.

Se mantiene íntegra en todo momento la funcionalidad de la membrana plasmática, evitando de este modo la salida al exterior del contenido intracelular.

Sólo a medida que avanza el proceso comienzan a producirse cambios en la membrana plasmática que comienza a tener circunvoluciones (ondulaciones en la superficie), con una apariencia vesicular. Hay translocación de la fosfatidilserina (fosfolípido originariamente enclavado en la membrana interna de la célula) a la superficie celular que va a actuar como señal de reconocimiento, facilitando el reconocimiento y la unión de la célula por los fagocitos, evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción de inflamación.

Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto.

Aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas, como las caspasas, necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular.

Posteriormente se produce condensación y fragmentación de la cromatina, por acción de endonucleasas endógenas, impidiendo ya la replicación celular, en fragmentos denominados oligonucleosomas<sup>124</sup>.

Una vez finalizado el proceso, aparecen los cuerpos apoptóticos que mantienen sus membranas intactas y que son reconocidos por los macrófagos o las células dendríticas procediendo a su fagocitación, impidiendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria.

### 1.3.1 Vías de Señalización de la Apoptosis

Existen dos principales rutas de señalización mediante las cuales una célula se vuelve apoptótica.

La vía extrínseca, la cual es iniciada por la unión de ligandos específicos a ciertos receptores de la superficie celular llamados receptores de la muerte. Esta interacción lleva a la activación de la caspasa 8 quien comienza una cascada de activación de otras moléculas llevando a la muerte celular<sup>125</sup>.

La otra vía corresponde a la intrínseca, la cual es iniciada a nivel mitocondrial, se inicia como respuesta a un estrés ambiental (calor, rayos x, radiación ultravioleta,) a daño en el ADN (lesiones genéticas) o a la presencia de proteínas mal plegadas (estrés endoplásmico). Estos acontecimientos alteran la función de la mitocondria y lleva a la conformación del apoptosoma, un complejo de proteínas que genera la activación de la caspasa 9 quien inicia la cascada que llevará a la muerte por apoptosis<sup>125</sup>.

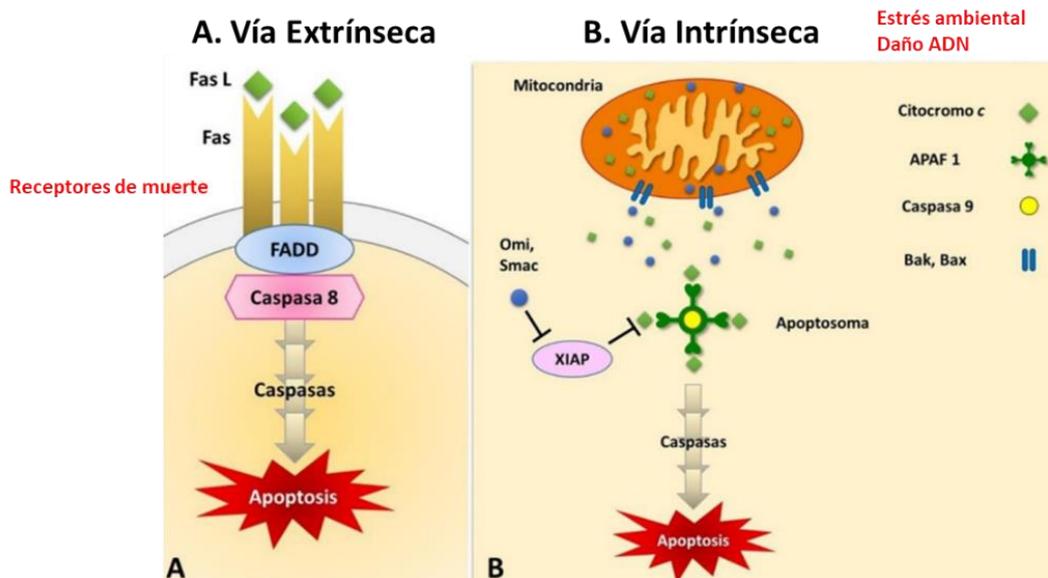
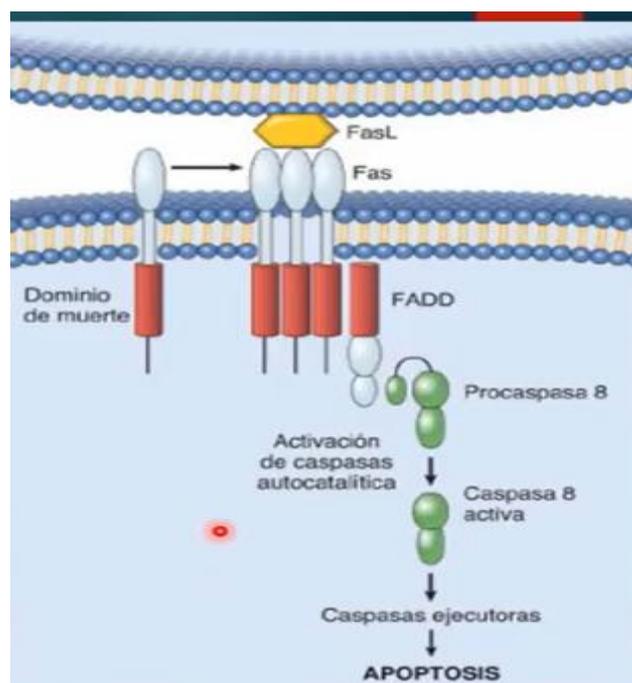


Fig.1.24. Dos vías de señalización de apoptosis. Las dos rutas utilizan caspasas iniciadoras distinta 8 y 9, pero caspasas efectoras comunes<sup>126</sup>.

### 1.3.2 Regulación de la Apoptosis

La regulación de la apoptosis está mediada en gran parte por dos familias de proteínas, las caspasas<sup>127</sup> y las proteínas de la familia BCL-2, que son las ejecutoras y las reguladoras de la apoptosis<sup>128</sup>.

La vía extrínseca involucra la unión de ligandos a los receptores de muerte transmembrana de la superficie celular. Los receptores de muerte mejor conocidos son TNF-1 y FAS (CD95)<sup>129</sup>. Tienen como característica poseer un motivo extracelular conservado, rico en cisteína, que es el sitio de unión del ligando al receptor, como el receptor Fas (CD95) y su ligando FasL, que se expresa predominantemente en células T activadas, LTc, neutrófilos y linfocitos NK activados. En el caso del receptor FAS cuando se une con su ligando natural FasL provoca la agregación de tres o más moléculas Fas ya que cada uno de estos receptores tiene dominios de muerte (DD) intracelulares, que cuando el receptor se une al ligando, funcionan como proteína de unión, produciendo una trimerización del receptor, al provocar la agregación de 3 o más receptores FAS y el reclutamiento de un gran complejo de proteínas adaptadoras que contienen un dominio de muerte citosólico FADD (proteína con dominio de muerte asociado a Fas), que contiene dos dominios importantes, que son el dominio DD, con el cual interacciona Fas, y el dominio efector de muerte (DED), que es el encargado de transmitir la señal apoptótica a los efectores, es decir a las caspasas, en este caso, caspasa 8, ya que tienen también un dominio DED<sup>130</sup>. Estas proteínas adaptadoras permiten la unión de la procaspasa 8, favoreciendo su autoactivación, que desemboca en vías de transducción de señales apoptóticas. A continuación, activa una serie de caspasas posteriores<sup>131</sup> iniciando de esta manera una cascada de caspasas que conducen a la apoptosis.



**Fig.1.25 Vía Extrínseca: activación de caspasas por medio de receptores de muerte, en este caso FAS<sup>132</sup>.**

La vía intrínseca se desencadena por cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Dichos cambios se desencadenan por distintas condiciones que dan lugar a estrés intracelular, como daño genético, concentraciones elevadas de calcio en el citosol o estrés oxidativo grave, entre otras, que provocan la activación de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa permitiendo la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol<sup>133</sup>.

La familia BCL-2 son encargados de regular la apoptosis, ejerciendo su acción sobre la mitocondria. Dentro de la familia BCL-2, encontramos miembros proapoptóticos como Bax y Bak y Bim que actúan promoviendo la liberación de citocromo c desde la mitocondria y miembros antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL, se encuentran en la membrana externa de la mitocondria e inhiben la liberación de citocromo c<sup>134,135</sup>.

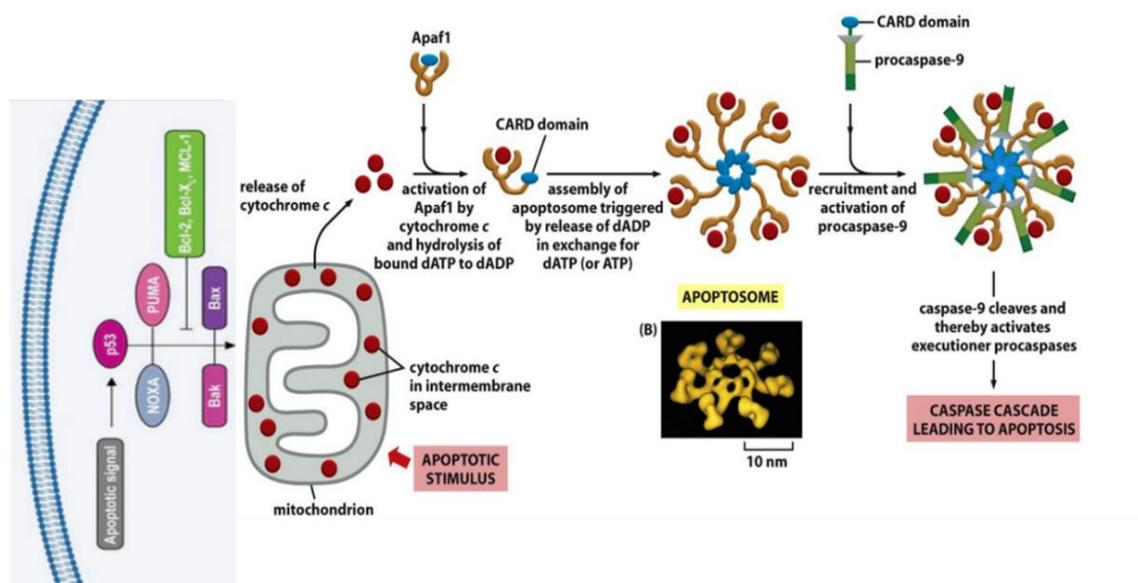


Fig.1.26 Vía Intrínseca <sup>136</sup>.

El citocromo c en el citosol se une a la región C-terminal del factor de activación de apoptosis (Apaf-1). El Apaf-1, está formado por tres dominios: dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), dominio de unión al dATP y dominio Y. En condiciones normales se encuentra en el citosol en forma inerte. Una vez recibidas por la célula las señales de muerte, el citocromo c sale de la mitocondria. Al unirse el citocromo c y el dATP a la molécula de Apaf-1, ésta se activa y se abre dejando al exterior la superficie de oligomerización. Varias unidades Apaf-1 se unen formando el apoptosoma, dejando la zona CARD en el centro que es donde van a unirse las procaspasas-9 inactivas, que se activarán a caspasa 9 <sup>137</sup>.

La caspasa 9 activa, activa sucesivamente, las procaspasa 3 y 7 que son las caspasas ejecutoras, responsables de la rotura de varias proteínas que lideran las características químicas y morfológicas de la apoptosis <sup>138</sup>.

La conexión de la vía extrínseca con la intrínseca la realiza P53, factor de transcripción específico de secuencia. Cuando el DNA está dañado, se acumula p53 en la célula y detiene el ciclo celular en G1, esperando la reparación. Si esto no es posible p53 media la apoptosis mediante la regulación transcripcional de Bid. Este miembro

proapoptótico de la familia Bcl-2 es activado por caspasa 8, que es activada por la vía extrínseca, y una vez activado Bid es capaz de translocarse a la mitocondria y activar a Bak, desencadenando la activación de la ruta intrínseca <sup>139</sup>.

### 1.3.3 Las caspasas

Las caspasas (cisteín aspartato proteasas) constituyen una familia de enzimas proteolíticas altamente conservadas en la evolución y son componentes centrales de la maquinaria responsable de la apoptosis. Son responsables de los cambios morfológicos típicos de las células apoptóticas hasta la degradación proteolítica que es irreversible y conlleva la muerte de la célula.

Ampliamente conocidas por su papel en la muerte celular y las respuestas inflamatorias.

En mamíferos se conocen 14 tipos de caspasas, las involucradas en la apoptosis se pueden dividir entre caspasas iniciadoras que incluyen caspasa-2, -8, -9 y -10, que son las primeras en activarse en respuesta a una señal y caspasas efectoras que incluyen caspasa-3, -6 y -7 <sup>140</sup>.

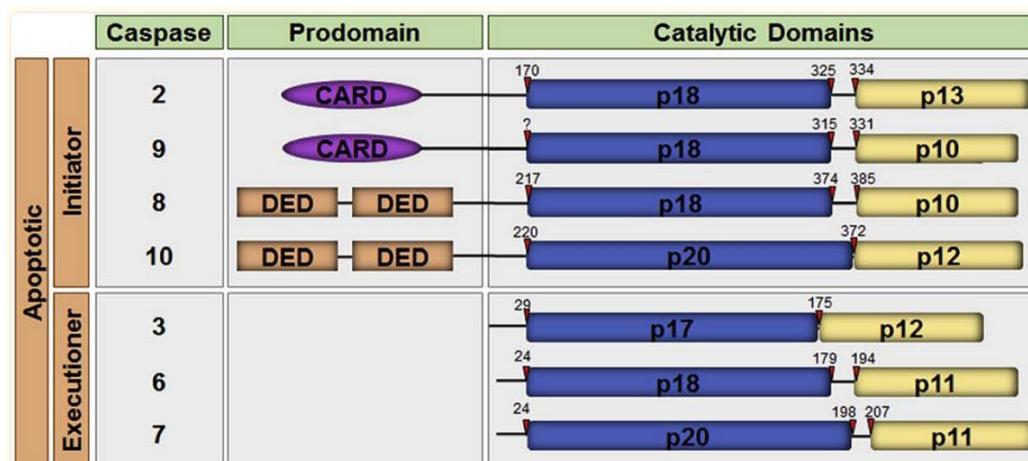


Fig.1.27 Caspasas apoptóticas <sup>141</sup>.

Las caspasas actúan en cascada, la activación de una caspasa efectora (como la caspasa-3 o -7) la realiza una caspasa iniciadora (como la caspasa-9) a través de la escisión en residuos internos específicos de aspartato.

Las caspasas se sintetizan en forma de precursores inactivos llamados zimógenos, que necesitan siempre una señal que las active, pasando de procaspasa a caspasa. Contienen un predominio unido a las subunidades enzimáticas grande y pequeña. Las caspasas iniciadoras tienen predominios largos que contienen los dominios de interacción proteína: proteína, dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) o dominio efector de muerte (DED), como se indica en la figura 1.27. Cuando se produce la activación proteolítica, se libera el predominio y las subunidades enzimáticas sufren un cambio conformacional para constituir la enzima activa.

Las caspasas efectoras, por el contrario, tienen el predominio corto, y son las responsables directas de la proteólisis de los sustratos celulares.



## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO



## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El sistema inmunológico juega un papel fundamental en la eliminación, así como en la progresión y mantenimiento del cáncer, debido al bloqueo de los mecanismos de inmunidad<sup>3</sup> por parte de las células cancerígenas.

Los  $LT\gamma\delta$ , son células a caballo entre la inmunidad innata y adquirida, y han demostrado ser imprescindibles para la defensa de nuestro organismo frente a infecciones y tumores<sup>142 143 144</sup>. Por esta razón han sido utilizados en ensayos clínicos en distintos tumores y específicamente en cáncer de colon <sup>145,146</sup>.

La línea de investigación de nuestro grupo ya describió una disminución de las poblaciones de  $LT\gamma\delta$  en sangre periférica en pacientes con enfermedad de Crohn<sup>147</sup>, y su correlación con un riesgo de recaída más precoz y formas más agresivas de la enfermedad<sup>148</sup>. La enfermedad de Crohn es una patología inflamatoria crónica intestinal con un riesgo establecido de CC, así como de otras enfermedades malignas. Por otro lado, se ha correlacionado la progresión de diferentes patologías malignas con aumentos de la apoptosis de las distintas subpoblaciones de  $LT$ <sup>149,150,151</sup>. Estas correlaciones nos hacían necesario extender nuestra línea de investigación al papel de las subpoblaciones  $LT\gamma\delta$  y su estado funcional en pacientes con CC.

La presencia de diferencias de las subpoblaciones de  $LT\gamma\delta$  y su estado efector comparando sujetos sanos y pacientes con CC permitiría establecer la existencia de mecanismos inmunogénicos en el desarrollo de la enfermedad tumoral,<sup>152</sup> pudiéndose convertir en una herramienta útil para el cribado poblacional, diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.



### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 3.1 Hipótesis

Nuestra hipótesis es que los pacientes con cáncer de colon podrían presentar una señal inmunológica diferenciada de los sujetos sanos a nivel de frecuencia y apoptosis en las poblaciones  $LT\gamma\delta$ , en sangre periférica.

### 3.2 Objetivo Principal

Medir en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon recién diagnosticados, las subpoblaciones linfocitarias  $T-\alpha\beta$ ,  $TCD4+-\alpha\beta$ ,  $TCD8+-\alpha\beta$ ,  $TCD56+-\alpha\beta$  y  $T-\gamma\delta$ ,  $TCD4+-\gamma\delta$ ,  $TCD8+-\gamma\delta$ ,  $TCD56+-\gamma\delta$ , y su grado de apoptosis, comparándolas con una población sana (control).

### 3.3 Objetivos Secundarios

Relacionar las subpoblaciones linfocitarias  $T-\alpha\beta$  y  $T-\gamma\delta$  y su grado de apoptosis con diferentes características clínicas – histológicas tumorales de los pacientes.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Población de estudio

Las personas que han participado en el presente estudio se han reclutado de forma prospectiva por el departamento de Cirugía. Eran pacientes recién diagnosticados de CC (estadios I a IV) y sin tratamiento previo ni farmacológico ni quirúrgico por los servicios de Oncología y Cirugía del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia. Los controles se obtuvieron a partir de endoscopias realizadas en el Servicio de Digestivo del Hospital Arnau de Vilanova procedentes del programa de prevención de cáncer de colon y cuyos tejidos eran normales. Durante la selección de casos y controles, todos ellos tuvieron que rellenar una encuesta sobre su estado de salud. Se descartó cualquier voluntario que presentara alguna enfermedad autoinmune o inmunodeficiencia, predisposición genética conocida para alguna patología, proceso infeccioso actual, vacunas en los seis meses previos, tratamiento inmunosupresor actual, hábitos alcohólicos y exposición a agentes tóxicos en el trabajo.

Todos los pacientes y donantes firmaron un Consentimiento Informado (ver 2 anexos) en el que se explicaba de manera somera las características del estudio.

El trabajo fue aprobado el día 29 de marzo de 2017 por el Comité de Ensayos Clínicos e Investigación del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, donde se ha llevado a cabo el trabajo.

Tras la selección para el estudio, tanto de los controles, como de los pacientes de cáncer de colon, antes de la cirugía, se obtuvo una muestra de sangre periférica por venopunción, en tubo con anticoagulante EDTA-K2. Se obtuvieron muestras de sangre basal de 96 pacientes con diagnóstico reciente de adenocarcinoma de colon infiltrante y 48 voluntarios sanos. Se obtuvo de todos los pacientes con CC el informe patológico tras la cirugía. Se descartaron los pacientes con cáncer rectal por problemas de superposición de otro estudio en marcha dentro del hospital.

La muestra fue procesada siempre dentro de las dos horas posteriores a su toma.

## 4.2 Aparatos y materiales utilizados

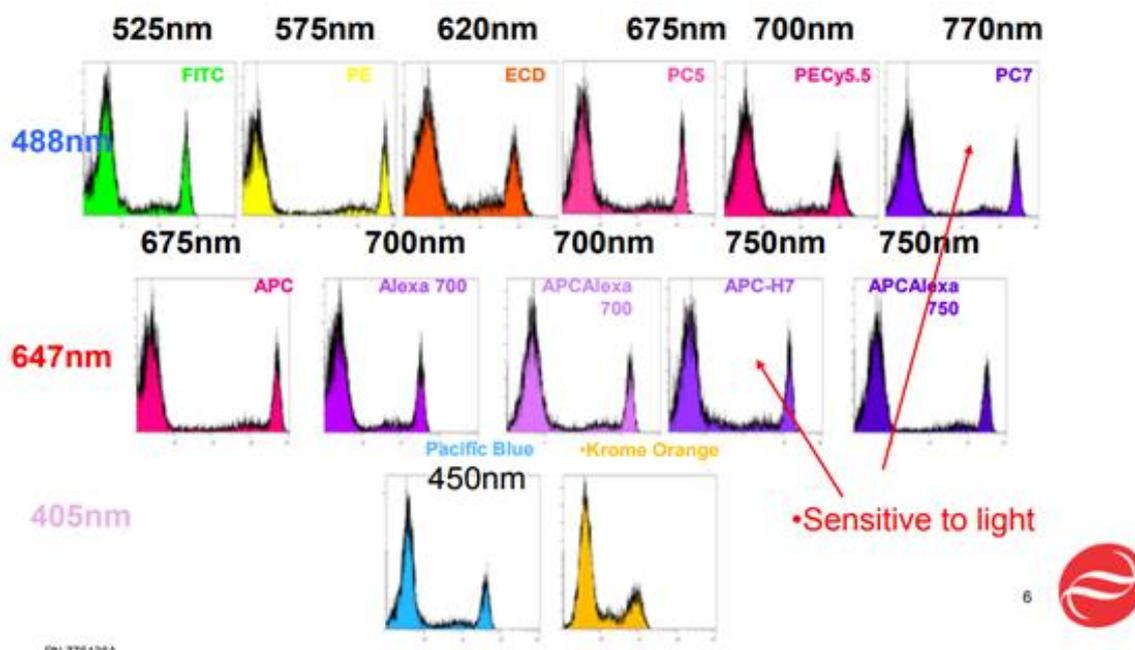
### 4.2.1 Contador celular

Una vez obtenida la muestra, se realizó una hematimetría básica en un contador celular (LH750 Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA) para obtener los valores de hemoglobina, leucocitos y diferencial leucocitario y plaquetas.

### 4.2.2 Citómetro de flujo

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó un citómetro de flujo:

- Navios (Beckman Coulter, Inc): puede medir simultáneamente 10 fluorescencias usando tres láseres: azul de 488nm, rojo de 647nm y violeta a 405 nm.



**Fig.4.1** Representación esquemática de espectros de excitación/emisión de los fluorocromos más comunes (Beckman Coulter, Inc).

Láseres con filtros de paso de banda de 525nm, 575nm, 620nm, 695nm y 755nm para el láser azul, Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), 7-amino-actinomycin D (7-AAD), R-Phycoerythrin (PE) y R-Phycoerythrin-Cyanine 7 (PC7), 660nm, 725nm y 755nm para el láser rojo, (Allophycocyanin (APC) – Alexa Fluor 700, Allophycocyanin (APC) Alexa Fluor750) y filtros de 450nm y 550nm para el láser violeta, Pacific Blue (PB) y Krome Orange (KrO).

FLUOROCROMO	LÁSER QUE EXCITA	PICO DE LONGITUD DE ONDA DE EXCITACIÓN (NM)	PICO DE LONGITUD DE ONDA DE EMISIÓN (NM)	FLUOROCROMOS EN TÁNDEM
<b>FITC</b>	Azul	490	525	No
<b>PE</b>	Azul	488	575	No
<b>7-AAD</b>	Azul	543	655	No
<b>PC7</b>	Azul	488	770	Si
<b>APC - Alexa Fluor 700</b>	Rojo	633/638	720	Si
<b>APC - Alexa Fluor 750</b>	Rojo	633/638	775	Si
<b>Pacific Blue</b>	Violeta	405	455	No
<b>Krome Orange</b>	Violeta	405	528	No

**Tabla 4.1 Principales características de los fluorocromos utilizados.**

#### 4.2.3 Otros aparatos y materiales utilizados

- Tubos de polietileno (12x75mm) para preparación de muestras.
- Micropipetas Gilson.
- Centrífuga refrigerada.

#### 4.2.4 Anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de las subpoblaciones linfocitarias y determinación de su apoptosis.

La citometría de flujo es una técnica poderosa, desde una mayor comprensión de la biología molecular humana y la expansión de la utilización de diferentes clones de

anticuerpos monoclonales y fluorocromos, se ha conseguido que, con varios marcadores, podamos distinguir las diferentes subpoblaciones linfocitarias.

Para ello es fundamental optimizar la preparación de la muestra, la configuración del panel y las estrategias de análisis.

El panel que hemos configurado consta de 2 tubos de 8 colores que miden un total de 9 antígenos específicos. Utilizamos 9 marcadores de superficie.

Para el análisis de las distintas subpoblaciones linfocitarias se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de Beckman Coulter, Inc, Miami, USA.

CD45, CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, anti-TCR PAN  $\alpha\beta$  y anti-TCR PAN  $\gamma\delta$ .

Anticuerpos Monoclonales	Clon	Fluorocromo	Antígeno	Expresión
<b>CD45</b>	J33	Krome Orange	Denominado antígeno leucocitario común o panleucocitario consiste en una secuencia extracelular, proximal a la membrana que es común a todas las isoformas de CD45. Las moléculas de CD45 son glicoproteínas transmembrana con un peso molecular de 180-220 kDa, con actividad tirosinfosfatasas de las que existen al menos 8 isoformas.	El epítipo no restringido de CD45 está presente en la superficie de todos los leucocitos humanos, con una mayor expresión en los linfocitos, siendo un componente principal en su membrana. Está ausente en plaquetas y hematíes ya que se pierde en el proceso de maduración de la serie roja en la médula ósea.
<b>CD3</b>	UCHT1	APC-Alexa Fluor 700	CD3 es parte de un complejo mayor que incluye al receptor de célula T (TCR). El antígeno CD3 es un complejo de 5 cadenas polipeptídicas invariantes, con pesos moleculares que oscilan entre 16 y 28 kDa, que se asocian de dos en dos formando 3 clases de dímeros.	El anticuerpo monoclonal UCHT1 reacciona con la cadena $\epsilon$ del complejo CD3. Este complejo se expresa en células T maduras y timocitos.
<b>CD4</b>	13B8.2	APC-Alexa Fluor 750	Participa en la adhesión de las células T a moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II, siendo correceptor en la activación inducida por antígenos con restricción MHC tipo II. Confiere a la célula el papel	CD4 se expresa en los Linfocitos T colaboradores. También está presente en la mayoría de los timocitos que frecuentemente coexpresan CD8. CD4 también se expresa en monocitos, aunque con una intensidad

			de colaborador o <i>helper</i> El antígeno CD4 es una glicoproteína transmembrana de cadena simple de peso molecular 59 kDa de tipo inmunoglobulinas.	de expresión algo menor que la de los linfocitos.
<b>CD8</b>	B9.11	Pacific Blue	Participa como correceptor en la estabilización de la adhesión del receptor de linfocitos T a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I (MHC I). El antígeno CD8 es un dímero disulfuro que existe como un homodímero CD8 $\alpha$ o bien como un heterodímero CD8 $\alpha\beta$ . El peso molecular de cada monómero a o b es entre 32 y 34 kDa. I.	CD8 se expresa en un subgrupo de LT de sangre periférica, los LT citotóxicos. También se expresa en un grupo de linfocitos asesinos naturales, Natural Killer (NK) pero con una intensidad de expresión más débil que la de los LT. El homodímero CD8 $\alpha$ se expresa en células NK y LT $\gamma\delta$ . CD8 también está presente en la mayoría de los timocitos que frecuentemente coexpresan CD4.
<b>CD56</b>	N901 (NKH-1)	PC7	Molécula de adhesión de la célula neural (NCAM). El antígeno CD56 es una glicoproteína de la superfamilia de inmunoglobulinas. Las diferentes isoformas de NCAM tienen pesos moleculares entre 135 y 220 kDa.	En el sistema hematopoyético, CD56 es el marcador de las células NK en un 80-90%, aunque también está presente en linfocitos T. CD56 no se expresa en granulocitos, monocitos o células B.
<b>CD19</b>	J3-119	PE	CD19 es un regulador esencial en el desarrollo, activación y diferenciación de los linfocitos B. El antígeno CD19, es una glicoproteína de membrana tipo I con un peso molecular de 95 kDa.	Esta molécula se expresa desde la primera etapa de linaje reconocible del linfocito B, a través del desarrollo hasta la diferenciación del linfocito B, pero se pierde en la maduración hasta células plasmáticas. También se encuentra en la superficie de células dendríticas foliculares.
<b>anti-TCR PAN <math>\gamma\delta</math></b>	clon: IMMU 510	PE	El antígeno TCR $\gamma\delta$ , es el receptor $\gamma\delta$ presente en las células T $\gamma\delta$ , las cuales representan un subconjunto pequeño (del 1,6 al 6,9 %) de las células CD3+ T sanguíneas periféricas. En las células T humanas, solo dos productos de genes $\delta$ V $\delta$ 1 y V $\delta$ 2, se utilizan normalmente por las células T $\gamma\delta$ .	Se expresa en las subpoblaciones linfocitarias T $\gamma\delta$ .

<b>anti-TCR PAN <math>\alpha\beta</math></b>	clon: IP26A	PE	El antígeno TCR $\alpha/\beta$ , presente en las células T $\alpha/\beta$ , representan entre el 89,4% a 98,4% de las células CD3+ T sanguíneas periféricas. Está formado por dos cadenas polipeptídicas distintas, asociadas con cadenas polisacáridas, $\alpha$ y $\beta$ unidas entre sí por puentes disulfuro, en una secuencia cercana a la membrana.	Se expresa en las subpoblaciones linfocitarias T $\alpha\beta$ . El anticuerpo IP26A reconoce un determinante monomórfico de la cadena $\alpha\beta$ del complejo TCR.
--	----------------	----	--	--

**Tabla 4.2 Principales características de los anticuerpos utilizados para la determinación de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.**

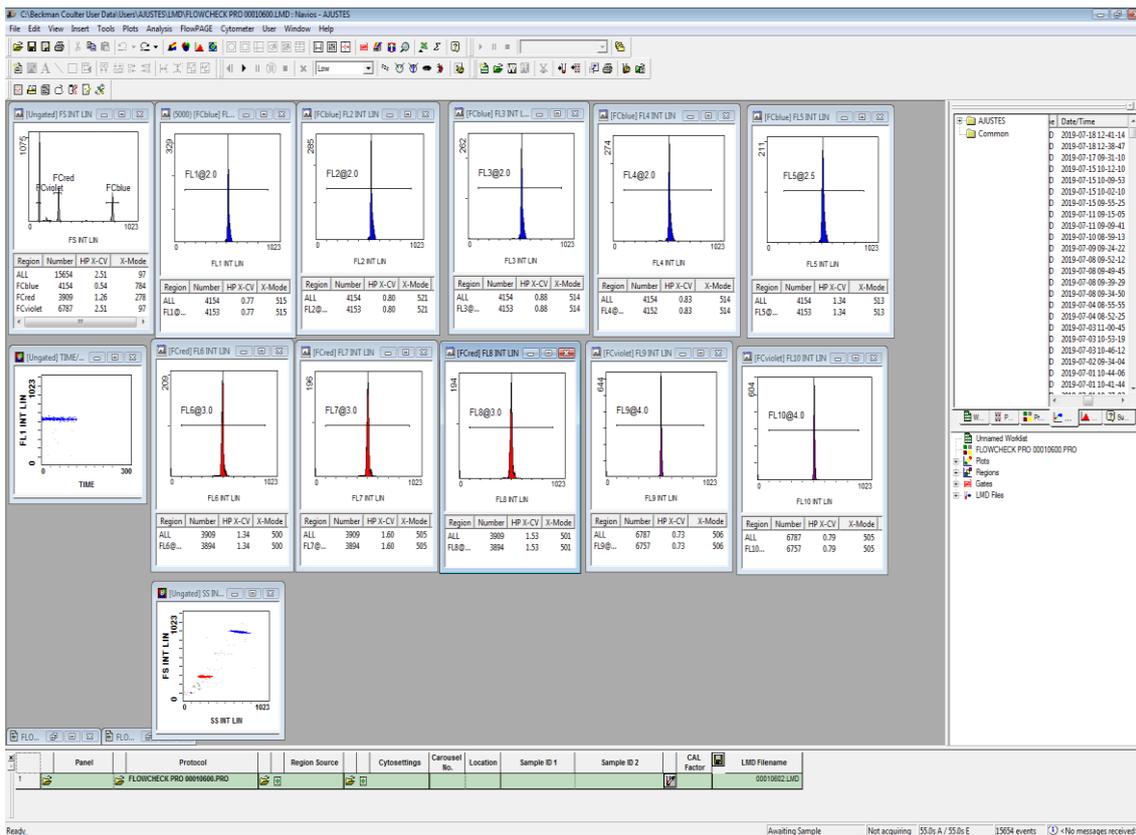
Para la determinación de la apoptosis linfocitaria se utilizó el Kit comercial ANNEXIN A5 FITC / 7-AAD de Beckman Coulter, Inc, Miami, USA.

<b>Anticuerpos Monoclonales</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Expresión</b>
<b>AnV</b>	FITC	Fosfatidilserina (PS), fosfolípido, originariamente enclavado en la membrana interna de la célula. Cuando la célula entra en estado de apoptosis, pasa al exterior de la membrana plasmática, forma una de las señales específicas para el reconocimiento por macrófagos para su eliminación.	En la membrana de linfocitos que están en estado de apoptosis. Los linfocitos apoptóticos pierden la asimetría de los fosfolípidos de la membrana y exponen la fosfatidilserina en el prospecto externo de la membrana plasmática.
<b>Marcador de Viabilidad</b>	7-AAD	ADN de los linfocitos. núcleo de las células muertas, que queda accesible al 7-AAD.	Células no viables (apoptóticas tardías o necróticas).

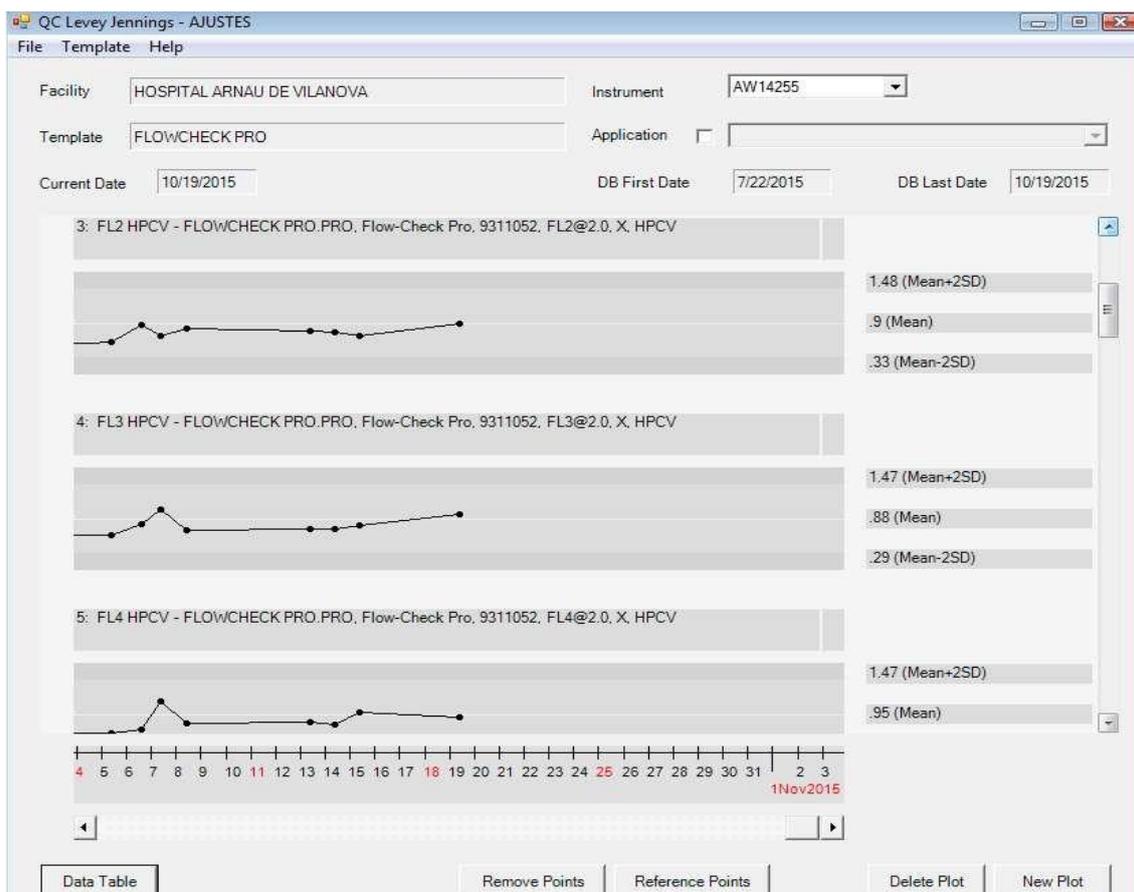
**Tabla 4.3 Principales características de los anticuerpos utilizados para la determinación de la apoptosis de las distintas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias.**

### 4.3 Protocolos de CMF empleados

A diario se realizó una verificación del citómetro de flujo con una suspensión de microesferas fluorescentes que permiten una estandarización de la dispersión frontal, “Forward Scatter” (FS), de la dispersión lateral “Side Scatter” (SS) y los láseres (Flow-set Pro Fluorospheres, Beckman Coulter, Inc.) y el correcto funcionamiento del citómetro antes de trabajar (Flow-check Pro Fluorospheres, Beckman Coulter, Inc.). Siguiendo las recomendaciones del fabricante se realizó la validación: dispensar aproximadamente 0,5 mL de reactivo de calibración en un tubo de polietileno (12x75mm). Agitar vigorosamente y adquirir por el protocolo de ajuste adecuado (Figura. 4.2). Verificar en las curvas de Levey-Jennings generada, que los coeficientes de variación entran en el rango adecuado (Figura 4.3).



**Fig.4.2 Protocolo de adquisición de esferas de validación mostrando los picos de fluorescencia media. (Flow-check Pro Fluorospheres, Beckman Coulter, Inc.).**



**Fig.4.3** Ejemplo de Curvas de Levey-Jennings donde se registra la evolución del equipo a lo largo del tiempo con el seguimiento de los parámetros de interés.

#### 4.3.1 Compensación de fluorescencias.

La compensación es un componente crucial a tener en cuenta en la optimización del funcionamiento de un citómetro de flujo. Una compensación incorrecta puede conducir a una interpretación errónea en la expresión de antígenos, dando falsos positivos o falsos negativos. En primer lugar, realizamos un ajuste de los voltajes FS y SS con una muestra control de sangre periférica sin marcar, de modo que dejamos las poblaciones negativas en la primera década logarítmica con una intensidad media de fluorescencia de 0,2 (ajustada de manera arbitraria). Seguidamente, realizamos un marcaje de la sangre periférica con los anticuerpos conjugados con cada uno de los fluorocromos por separado para cada una de las fluorescencias a compensar. Como todos los marcadores utilizados

tienen expresión en sangre periférica tanto de donante sano, como de un paciente de cáncer, utilizamos esta sangre en lugar de células de captura.

Ejecutamos la adquisición de los tubos anteriormente mencionados adquiriendo, 20.000 eventos totales a velocidad media, con los voltajes establecidos previamente. Con los datos obtenidos de cada adquisición se realizó una compensación automática por el software de análisis Kaluza (Beckman Coulter, Inc). Una vez que se ha ajustado la compensación en Kaluza, esta matriz de compensación la trasladamos al protocolo de adquisición donde tenemos guardados los voltajes iniciales, de modo que los archivos LMD futuros se registren con esta matriz. Por último, se añadió un tubo de verificación con el marcaje de todos los fluorocromos y por tanto fluorescencias, que componen el panel de estudio. En la tabla 4.4 podemos observar la matriz de compensación obtenida para el análisis a 10 colores.

Spillover (%)										
	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
FL1		1,50	0,20	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40
FL2	16,70		8,90	0,80	1,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
FL3	8,50	36,70		25,40	0,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
FL4	2,40	10,10	44,20		0,20	0,10	0,30	0,00	0,00	0,00
FL5	0,00	0,90	3,80	17,90		0,00	0,20	1,70	0,00	0,00
FL6	0,00	0,00	0,20	6,60	0,20		8,60	14,50	0,00	0,00
FL7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	20,80		6,40	0,00	0,00
FL8	0,00	0,00	0,00	0,00	9,00	4,20	23,60		0,10	0,00
FL9	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		1,40
FL10	1,00	3,20	0,00	0,30	1,10	0,00	0,10	0,30	13,70	

**Tabla 4.4 Matriz de compensación.**

### 4.3.2 Protocolos de marcaje.

El marcaje llevado a cabo está basado en la capacidad de los anticuerpos monoclonales específicos de unirse a células leucocitarias mediante los determinantes antigénicos que éstas expresan en la membrana celular (o incluso intracitoplasmáticamente).

Se utilizan anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos concretos que vienen ya marcados con el fluorocromo.

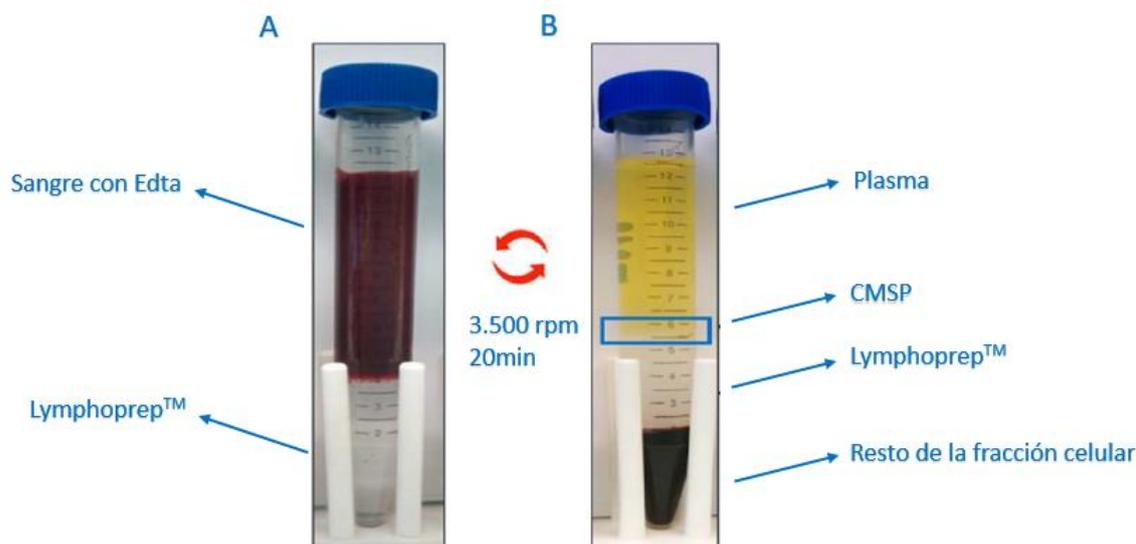
Se incubaba la muestra con el anticuerpo monoclonal y los linfocitos son analizados por CMF. Dentro de una ventana electrónica seleccionamos la población de interés, definida en un histograma que relaciona los parámetros que deseamos estudiar.

A continuación, se detalla el protocolo de marcaje.

#### 4.3.2.1 Protocolo de marcaje para la determinación de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha/\beta$ , $\gamma/\delta$ y su apoptosis.

En primer lugar, obtuvimos un enriquecimiento de la muestra en linfocitos mediante separación de células por gradiente de densidad. Es una técnica para separar células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de otras células de la sangre.

Para el proceso hemos utilizado el reactivo Lymphoprep™ (Palex Mediacal SA). Durante la centrifugación (3.500 rpm durante 20 minutos) se van formando varias capas debido a las diferentes densidades. El sedimento está formado principalmente por granulocitos y eritrocitos que han migrado a través de la gradiente de densidad por tener mayor densidad que el Lymphoprep™ y por la tendencia a formar agrupaciones (en el caso de granulocitos). Encima se situaría la capa de Lymphoprep™, que es menos denso que el sedimento y encima habría otra capa fina opalescente que serían las CMSP (linfocitos y monocitos) que tienen menor densidad. Finalmente, sobre esa capa se situarían las plaquetas y el plasma, que se pueden eliminar en los siguientes lavados (fig. 4.4).



**Fig.4.4. Representación de un gradiente de densidad con Lymphoprep™, antes (A) y después (B) de la centrifugación.**

Tras el enriquecimiento de la muestra en linfocitos mediante separación de células por gradiente de densidad (Figura 4.4), seleccionamos por aspiración y las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se resuspendieron las células obtenidas en tampón de unión (con presencia de  $\text{Ca}^{+2}$ ) a  $4^{\circ}\text{C}$ .

A continuación, se realizó el marcaje de las muestras:

La cuantificación de la apoptosis se ha realizado con el kit comercial ANNEXIN V-FITC / 7-AAD Kit (Beckman Coulter, Inc), en el cual la anexina-V está conjugada con FITC. La anexina es el nombre común por el que se conoce a un grupo de proteínas que se unen en presencia de calcio a fosfolípidos, presentando una gran afinidad por la fosfatidilserina (PS). En fases tempranas de la apoptosis, cuando la membrana celular se altera, la fosfatidilserina de la membrana interna de la célula es traslocada a la membrana externa, pudiéndose así unirse a ésta la Anexina V. Para distinguir las células en apoptosis tempranas de las necróticas que también exponen PS en su cara externa, como resultado de la pérdida de integridad de la membrana, marcamos también con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) que tiene especificidad de unión con la base de ADN guanina-citosina.

Esto se llevó a cabo cuantificando los residuos de fosfatidilserina expuestos en la parte exterior de la membrana celular mediante el marcaje con anexina V- FITC siguiendo las recomendaciones del fabricante.

1. Por cada muestra a analizar, rotulamos 2 tubos de polietileno (12x75mm)  $\alpha/\beta$  y  $\gamma/\delta$ . Añadimos 100  $\mu\text{L}$  de la muestra de análisis a cada tubo. Añadimos 10  $\mu\text{L}$  de anticuerpo monoclonal anti-TCR  $\alpha\beta$  en un tubo y 10  $\mu\text{L}$  de los anticuerpos anti-TCR  $\gamma\delta$  en el otro. Incubamos 10 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz.
2. Añadimos el volumen de anticuerpo de interés a cada tubo, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En nuestro caso, 10  $\mu\text{L}$  de la Anexina-V conjugada con FITC y 20  $\mu\text{L}$  del marcador de viabilidad 7AAD y 10  $\mu\text{L}$  de los anticuerpos conjugados con PE, y PC7 y 2,5  $\mu\text{L}$  de los anticuerpos conjugados con APC Alexa Fluor700, APC Alexa Fluor750, Pacific Blue y Krome Orange).
3. Incubamos 15 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz.
4. A continuación, añadimos 1 ml de mezcla "Fix-and-Lyse, utilizamos el agente lisante VersaLyse (Beckman Coulter, Inc), que consiste en una amina que es convertida en un agente lítico por la anhidrasa carbónica de la membrana de los glóbulos rojos. Al agente lisante, se le adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de un agente fijador (IOT3 Fixative solution, Beckman Coulter, Inc) que proporciona estabilidad. Mezclamos e incubamos 20 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz.
5. Añadimos 2 mL de PBS. Centrifugamos 5 minutos a 1500 rpm y a temperatura ambiente.
6. Eliminamos el sobrenadante por aspiración y resuspendemos el botón celular en 0,5 mL de PBS.
7. Adquirimos inmediatamente por el citómetro de flujo. En todos los tubos se adquirieron un total de 200.000 eventos.

La combinación de anticuerpos monoclonales con sus respectivos fluorocromos conjugados fue desarrollada en el Laboratorio de Hematología del Hospital Arnau de

Vilanova durante la puesta a punto de la determinación de las subpoblaciones linfocitarias  $\alpha/\beta$  y  $\gamma/\delta$ , adicionando los marcadores para estudiar la apoptosis.

En la tabla 4.5 podemos ver el panel de anticuerpos utilizado en el presente trabajo.

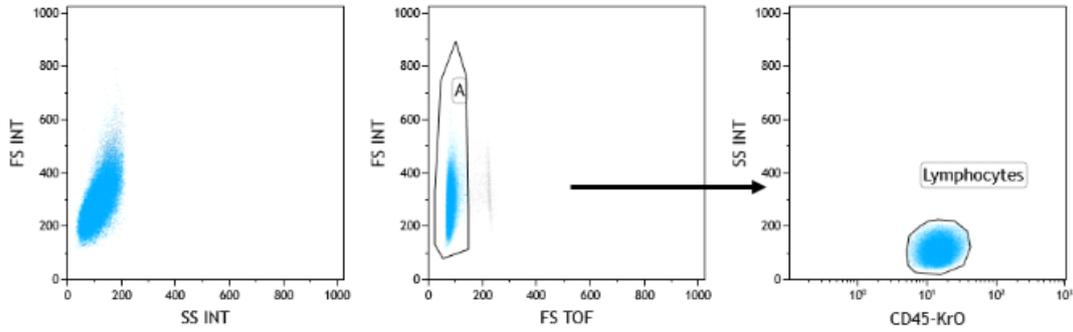
	FITC	PE		7AAD	PC7	Alexa Flúor 700 APC	Alexa Flúor 750 APC	Pacific Blue	KrO
Tubo 1	AnexinaV	Anti TCR- $\alpha/\beta$ CD19		7AAD	CD56	CD3	CD4	CD8	CD45
Tubo 2	AnexinaV	Anti TCR- $\gamma/\delta$ CD19		7AAD	CD56	CD3	CD4	CD8	CD45

**Tabla 4.5 Panel de anticuerpos monoclonales empleados en el análisis de las subpoblaciones y apoptosis.**

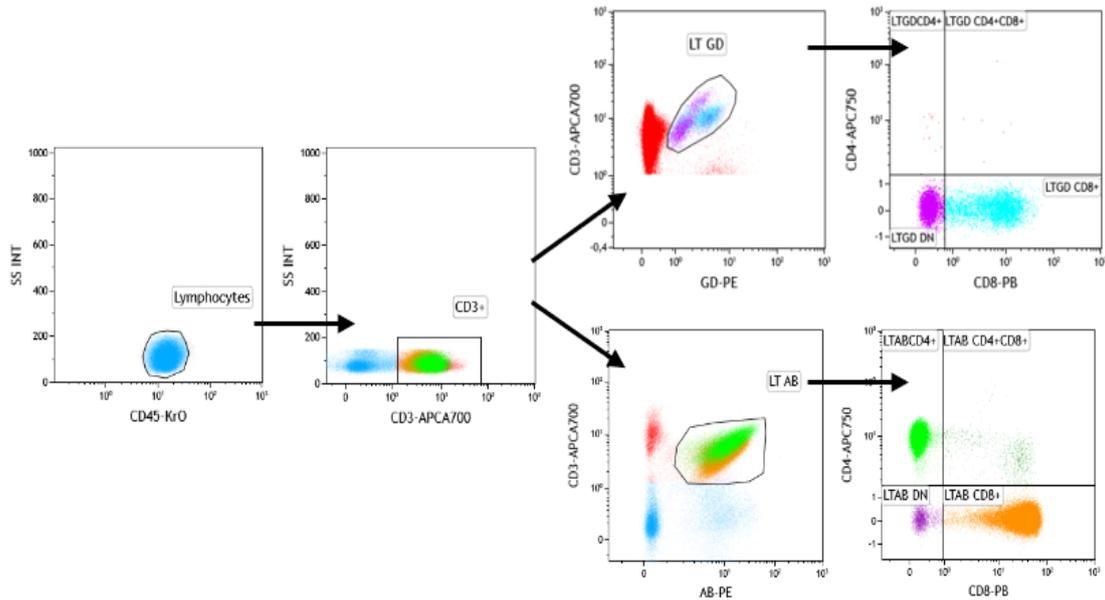
En las figuras 4.5, 4.6 y 4.7 podemos ver la estrategia de gating utilizada para el estudio de las distintas subpoblaciones celulares.

Como muestra la figura 4.5, lo primero que hacemos es eliminar los falsos positivos por posibles dobletes, como podemos observar en el histograma que enfrenta FS INT / FS TOF. Que relaciona el tiempo que tarda en pasar una célula, con su tamaño celular, así discriminamos las células que pasan unidas, que serían falsos positivos.

Desde esta selección diferenciamos los linfocitos, como vemos en el histograma SS INT / CD45-KrO.

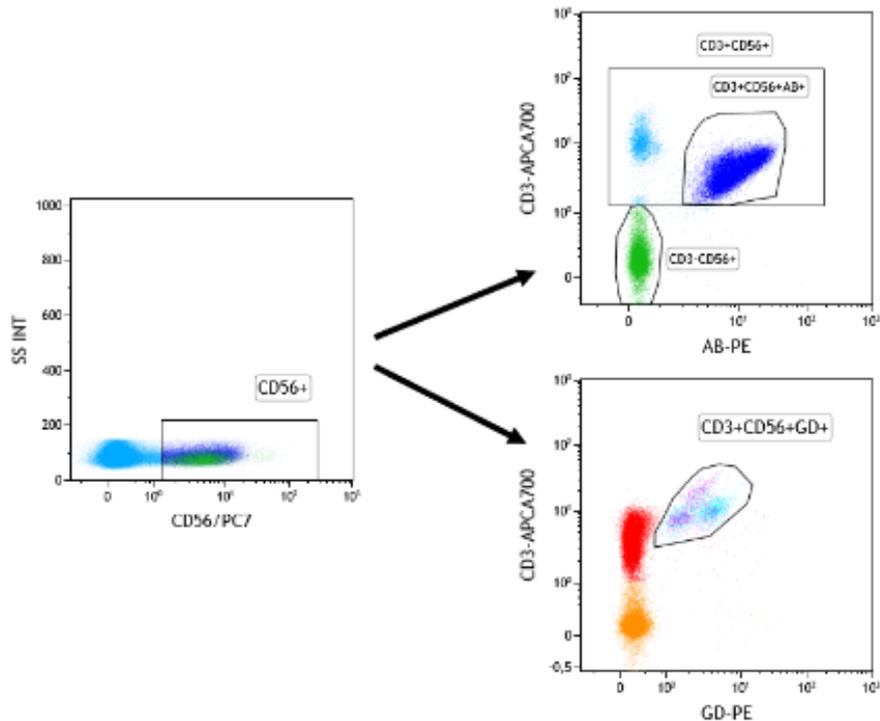


**Fig.4.5. Estrategia de gating de citometría de flujo que se siguió para diferenciar las diferentes subpoblaciones de células T. Desde sangre periférica, medimos los eventos enfrentando los parámetros de forward y side scatter y seleccionamos las CD45 positivas con lo que obtenemos los linfocitos totales.**



**Fig.4.6. Estrategia de gating de citometría de flujo que se siguió para diferenciar a partir de los linfocitos totales, las distintas subpoblaciones linfocitarias.**

Desde la población de linfocitos, se seleccionaron las células positivas para CD3, con lo que obtenemos las células T. Desde CD3 diferenciamos las subpoblaciones de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , y desde las mismas enfrentamos la expresión de CD4 frente a CD8. Los subconjuntos se analizaron en células CD3+CD4+CD8-, CD3+CD4-CD8+, CD3+CD4+CD8+ y CD3+CD4-CD8-.



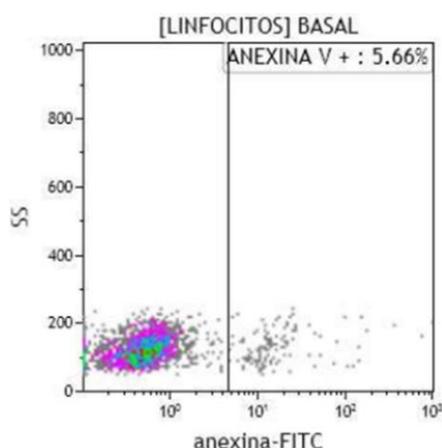
**Fig.4.7.** Las células CD3+CD56+ se analizaron en paralelo desde linfocitos totales.

Paralelamente, desde la población de linfocitos, se seleccionaron las células positivas para CD56. Desde CD56 diferenciamos las subpoblaciones de células NKs (CD3-CD56+) y NKTs (CD3+CD56+)  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ .

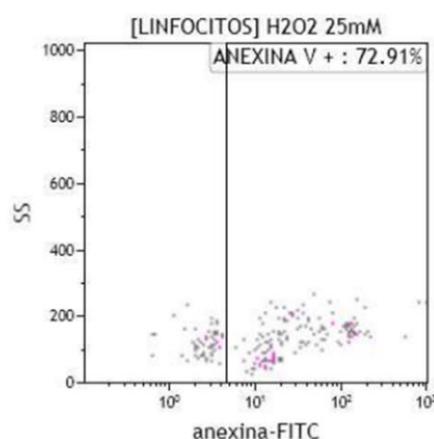
### 4.3.3 Determinación de la positividad para la anexina-V mediante peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno induce la fragmentación del ADN, cuando es aplicado como dosis única, siendo este inductor de apoptosis. La pérdida de capacidad metabólica y la generación de rupturas al ADN ocurren sin ruptura temprana de la membrana plasmática, ocurre un proceso de muerte celular programada.

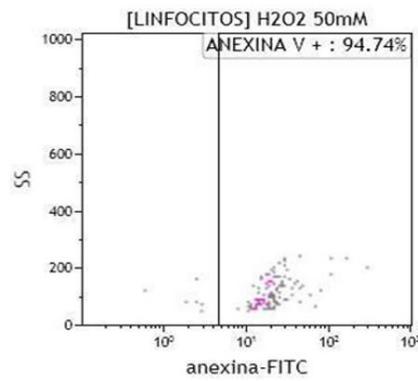
Así, para determinar el punto de corte donde comienza la positividad de la anexina V, se realizó una inducción de la apoptosis con peróxido de hidrógeno, se trató a los linfocitos con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (25 mM y 50 mM) durante 15 minutos. Las figuras 4.8, 4.9 y 4.10 muestran el aumento en el porcentaje de células positivas para anexina V (células que expresan en la membrana residuos de fosfatidilserina, por estar en apoptosis) según aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno en el experimento.



**Fig.4.8.** % de células Anexina V+ basal

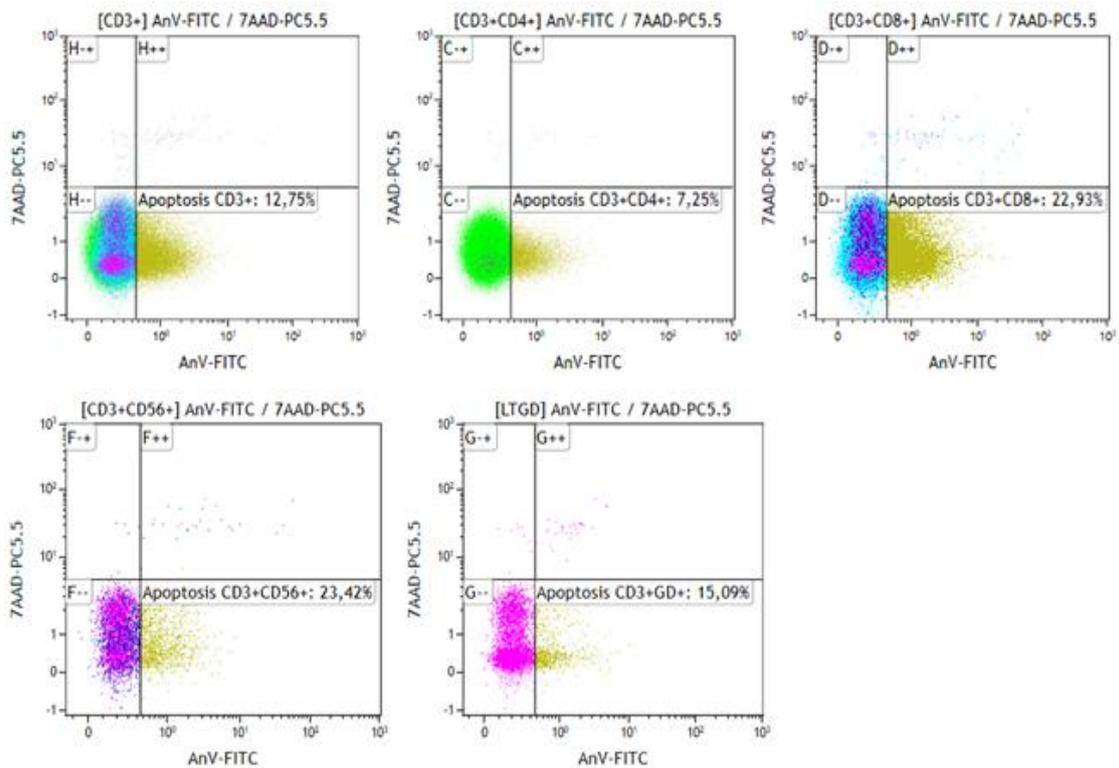


**Fig.4.9.** % de células Anexina V+ a una concentración 25mM de peróxido de hidrógeno.



**Fig.4.10.** % de células Anexina V positivas a una concentración 50 mM de peróxido de hidrógeno respectivamente.

En la figura 4.11 podemos ver la estrategia de gating utilizada para el estudio de la apoptosis. Muestra los histogramas Anexina V/ 7AAD, reflejando el porcentaje de células en apoptosis de cada población.



**Fig.4.11.** Medimos la apoptosis de las distintas subpoblaciones celulares seleccionadas previamente, enfrentando los parámetros 7AAD frente a Anexina V.

#### 4.4 Análisis estadísticos

Para la realización del mismo se emplea el programa SPSS versión 24. Los estadísticos descriptivos se expresan como frecuencias absolutas y relativas para todas las variables categóricas.

Lo primero fue determinar si las variables cuantitativas seguían una distribución normal, para ello aplicamos la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors. Cuando se asume normalidad se utiliza la prueba t de Student para comparar las medias. En caso de no aceptarse la hipótesis de normalidad de la variable cuantitativa se utiliza la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

	Estadístico	gl	Sig.
CD3+ $\alpha\beta$ x10 <sup>9</sup> /L	,095	144	,003
CD3+ CD4+ $\alpha\beta$ x10 <sup>9</sup> /L	,098	144	,002
CD3+ CD8+ $\alpha\beta$ x10 <sup>9</sup> /L	,118	144	,000
CD3+ CD56+ $\alpha\beta$ x10 <sup>9</sup> /L	,184	144	,000
CD3+ $\gamma\delta$ x10 <sup>9</sup> /L	,177	144	,000
CD3+ CD4+ $\gamma\delta$ x10 <sup>9</sup> /L	,471	144	,000
CD3+ CD8+ $\gamma\delta$ x10 <sup>9</sup> /L	,217	144	,000
CD3+ CD4- CD8- $\gamma\delta$ x10 <sup>9</sup> /L	,272	144	,000
CD3+ CD56+ $\gamma\delta$ x10 <sup>9</sup> /L	,228	144	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Tabla 4.6 Prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov, con la corrección de la significación de Lilliefors para las distintas subpoblaciones celulares.**

Se construyeron tablas de contingencias para las variables cualitativas. Como medida de asociación se calculó la Odds Ratio (OR) y su intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Se realizó un análisis multivariante (regresión logística) para valorar el peso específico de cada variable en relación a las demás.

El nivel de significación asumido fue del 95% ( $p < 0.05$ ).

## 4.5 Variables del estudio

### 4.5.1 Variables hematológicas

En el hemograma realizado se ha determinado la cantidad de leucocitos, linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, hemoglobina y plaquetas.

### 4.5.2 Variables inmunofenotípicas

En la tabla 4.7 podemos ver las variables fenotípicas estudiadas para cada población celular.

Variable Fenotípica	Descripción
<b>CD45+</b>	Denominado antígeno leucocitario común o panleucocitario permite cuantificar el porcentaje de linfocitos presentes en la muestra.
<b>CD3+</b>	Esta variable cuantifica el porcentaje de células CD3 positivas (LT) sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD4+CD8-</b>	Porcentaje de LT CD4 positivos, y negativos para el CD8 sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD4-CD8+</b>	Porcentaje de LT CD8 positivos y negativos para el CD4 sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD56+</b>	Porcentaje de LT positivos para el CD56 (NKT) sobre la población linfoide total.
<b>CD3+ <math>\alpha\beta</math></b>	Porcentaje de LT $\alpha\beta$ positivos sobre la población linfoide total.
<b>CD3+ <math>\gamma\delta</math></b>	Porcentaje de LT $\gamma\delta$ positivos sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD4+<math>\alpha\beta</math></b>	Porcentaje de LT positivos para el CD4 que coexpresan $\alpha\beta$ sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD4+<math>\gamma\delta</math></b>	Porcentaje de LT positivos para el CD4 que coexpresan $\gamma\delta$ sobre la población linfoide total.

<b>CD3+CD8+αβ</b>	Porcentaje de LT positivos para el CD8 que coexpresan αβ sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD8+γδ</b>	Porcentaje de LT positivos para el CD8 que coexpresan γδ sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD56+αβ</b>	Porcentaje de LT positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan αβ sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD56+γδ</b>	Porcentaje de LT positivos para el CD56 (NKT) que coexpresan γδ sobre la población linfoide total.
<b>CD3+CD4- CD8- γδ</b>	Porcentaje de LT negativos para el CD4+CD8+ que coexpresan γδ sobre la población linfoide total.

**Tabla 4.7 Variables fenotípicas estudiadas para cada población celular.**

#### 4.5.3 Variables clínicas

<b>Variables clínicas</b>
Estadificación del cáncer según el sistema TNM
Antecedente de tumor y en caso positivo qué tipo de tumor.
Tumor sincrónico y en caso positivo si es sincrónico recurrente.
Tratamiento activo de neoplasia previa.
Cáncer recurrente
Antecedentes familiares de cáncer
Poliposis
Síndrome de poliposis familiar
Localización del tumor (recto, sigma, colon izquierdo, colon transversal, colon derecho, ciego, apéndice).

**Tabla 4.8 Variables clínicas.** Datos recogidos a partir de la revisión de la historia clínica de los pacientes.

#### 4.5.4 Variables histopatológicas

<b>Variables histopatológicas</b>
Tamaño del tumor.
Grado histológico.
Tipo histológico según la OMS.
Número de ganglios resecaados.
Número de ganglios afectados.
Perforación.
Nivel de la invasión en la pared colónica.
Presencia de abscesificación.
Invasión perinerual.
Invasión angiolinfática.
Invasión vascular venosa.

**Tabla 4.9 Variables histopatológicas.** Datos recogidos mediante la revisión del informe anatomopatológico correspondiente a la pieza colónica resecaada.

## 5. RESULTADOS



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Distribución y características de los pacientes

Para el estudio de frecuencia y apoptosis en las subpoblaciones linfocitarias  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , se reclutó un total de 144 sujetos, 96 pacientes con cáncer de colon y 48 controles. La edad media de los pacientes con cáncer fue  $69,5 \pm 11,5$  años frente a  $65,9 \pm 10,4$  años en los controles ( $p=0.103$ ). 60 hombres y 36 mujeres en pacientes con cáncer, frente a 30 hombres y 18 mujeres en controles sanos. Los rasgos demográficos, estadificación, grado y características de la invasión del cáncer de los pacientes en estudio, se muestran en la tabla 5.1.

	<b>Casos Totales (n=96)</b>
Edad (años)	69,5±11,5
- Edad Hombres (años)	69,7±11,3
- Edad Mujeres (años)	69,2±11,9
Hombres	60 (62,5)
Mujeres	36 (37,5)
CEA (ng/ml)	8,3±17,4
CA 19-9 ( $\mu$ /ml)	14±14,9
Nº de pacientes con cáncer recurrente	8 (8,4)
Tiempo de recaída en relación a los pacientes recurrentes (meses)	10,4±6,6
Estadificación del cáncer.	
- 0	1 (1,1)
- I	31 (32,3)
- II	27 (28,1)
- III	33 (34,4)

RESULTADOS

-	IV	4 (4,2)
Grado de Diferenciación		
-	Bien Diferenciado	54 (56,3)
-	Moderado y Pobremente Diferenciado	42 (43,8)
Afectación Ganglionar		
37 (38,5)		
Localización Anatómica		
-	Colon Izquierdo	51 (53,1)
-	Colon Derecho	45 (46,9)
Invasión		
-	Invasión Vascular	7 (7,3)
-	Invasión Linfática	40 (41,7)
-	Invasión Perineural	6 (6,3)
Tejido		
-	Tamaño del Tumor (cm)	3,8±1,5
-	Distancia Margen Quirúrgico (cm)	8,4 ±7,5
-	Ganglios Linfáticos Analizados	17,1±8,1
-	Metástasis en Ganglios Linfáticos	1,3±2,2
Tipo Histológico		
N.º de pacientes		
-	Adenocarcinoma	75 (78,1)
-	Adenocarcinoma Mucinoso	14 (14,6)
-	Adenocarcinoma Infiltrante	6 (6,3)
-	Adenocarcinoma Neuroendocrino	1 (1,0)
Invasión		
N.º de pacientes		
-	Subserosa	43 (44,8)
-	Muscular	28 (29,2)
-	Submucosa	14 (14,6)
-	Serosa Visceral	5 (5,2)

-	Órgano vecino	5 (5,2)
-	In situ	1 (1,0)

**Tabla 5.1. Rasgos demográficos, clínicos y anatomopatológicos de pacientes con cáncer de colon.** Desviación estándar (DE), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno carbohidrato (CA), edad de los hombres vs edad de las mujeres,  $p=0.850$ . Tipo Histológico código (OMS) SNOMED (Systematized Nomenclature of Medicine), Tumor-Nódulo-Metástasis (TNM).

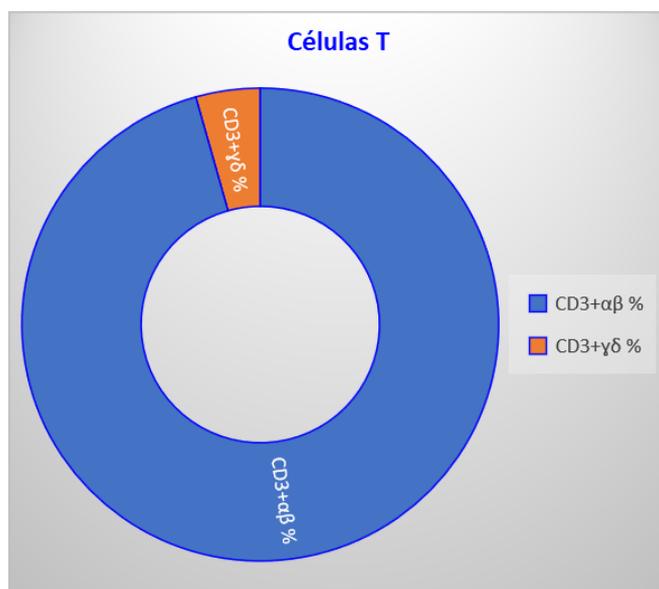
<i>Parámetro</i>	<i>CC (n=96)</i>	<i>Control (n=48)</i>	<i>Sig.(P)</i>
Leucocitos (x 10 <sup>9</sup> /l)	7,8±2,4	7±1,9	< 0,05
Neutrófilos (x 10 <sup>9</sup> /l)	5±2,3	4,2±1,6	< 0,05
Linfocitos (x 10 <sup>9</sup> /l)	2±0,7	2±0,6	0,57
Monocitos (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,6±0,3	0,7±0,7	0,28
Eosinófilos (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,2±0,2	0,2±0,2	0,26
Basófilos (x 10 <sup>9</sup> /l)	0	0	0,89
Hemoglobina (g/dl)	12,1±1,9	14,7±1,4	< 0,001
Plaquetas (x 10 <sup>9</sup> /l)	261±100	241±59	0,28

**Tabla 5.2. Análisis estadístico comparativo de la distribución de medias de los hemogramas de pacientes con CC vs voluntarios sanos.**

La tabla 5.2 muestra como los sujetos del grupo de pacientes con CC presentaron, en comparación con los sujetos del grupo control, niveles superiores, estadísticamente significativos, en parámetros habitualmente relacionados con procesos inflamatorios: recuento de plaquetas, leucocitos y neutrófilos. Los sujetos del grupo de pacientes con CC presentaron, con respecto a los del grupo control, niveles inferiores de hemoglobina significativos.

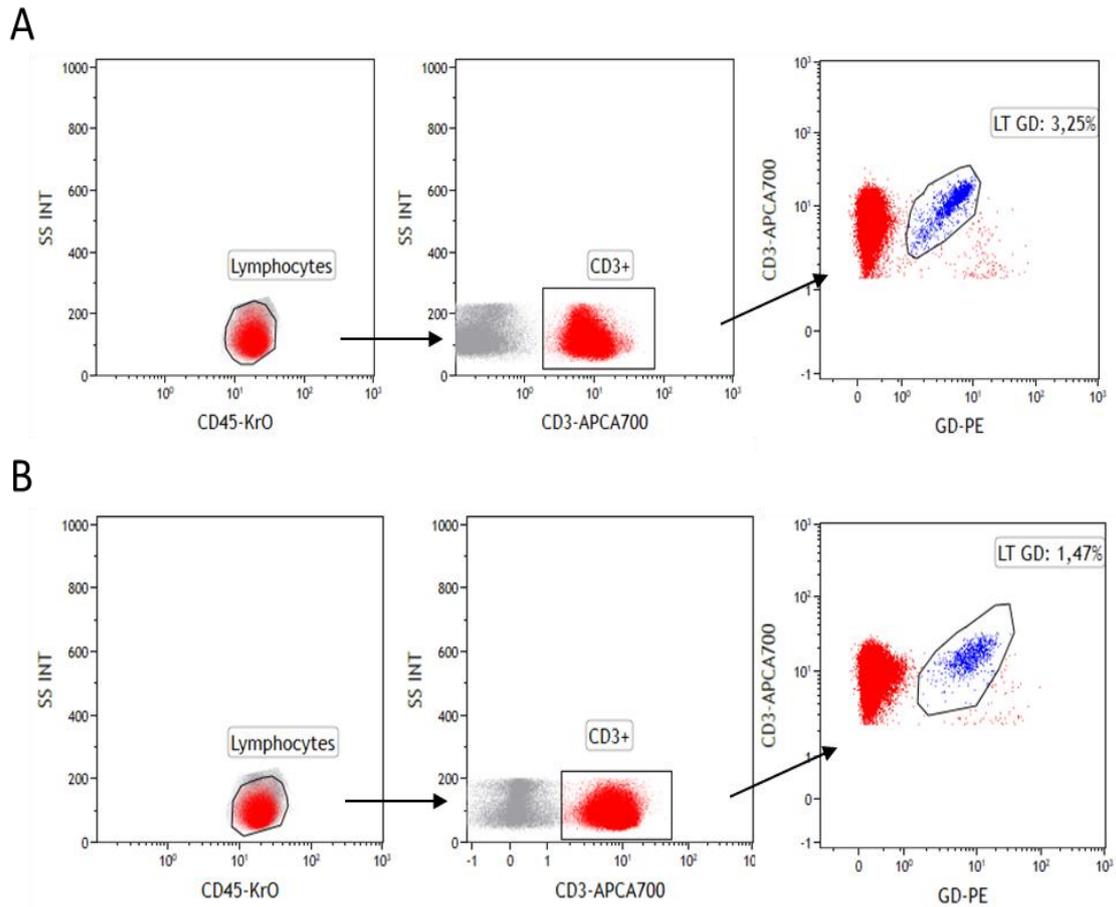
## 5.2 Frecuencia de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ .

La mayoría de los linfocitos T en sangre periférica muestran el receptor del tipo  $\alpha\beta$ , y una minoría de células T expresan el receptor con cadenas  $\gamma\delta$ . Fig.5.1.



**Fig.5.1.** Frecuencia de linfocitos T  $\gamma\delta$  frente a linfocitos T  $\alpha\beta$  en sangre periférica.

Si comparamos los porcentajes de linfocitos T  $\gamma\delta$  en sujetos control frente a pacientes con CC, vemos diferencias, como muestra la figura 5.2. Observamos una clara disminución  $\gamma\delta$  en los pacientes con CC respecto a voluntarios sanos.



**Fig.5.2. Estrategia de gating, donde observamos diferencia en el porcentaje de linfocitos T  $\gamma\delta$ , si comparamos voluntarios sanos (A) vs pacientes con CC (B).**

La figura 5.3 muestra como a partir de la distribución de los LT $\gamma\delta$  seleccionados en los histogramas anteriores, pudimos obtener la frecuencia de las distintas subpoblaciones linfocitarias.

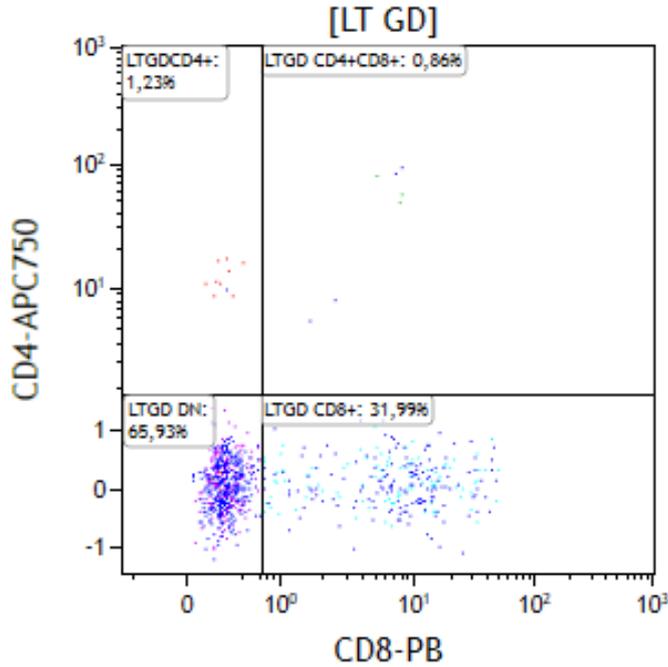
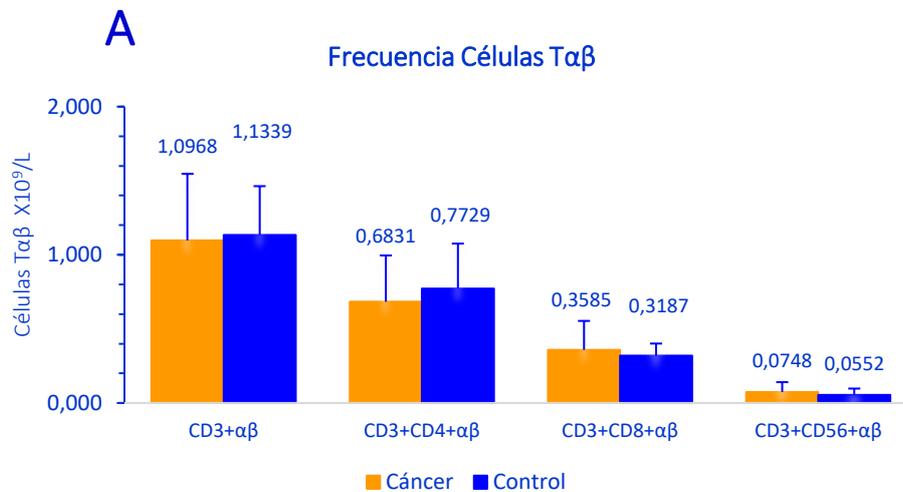
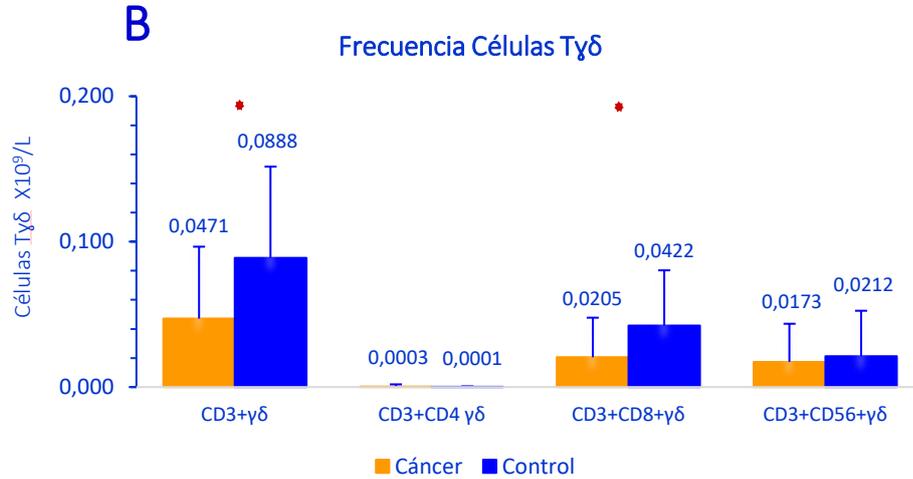


Fig.5.3 Histograma de análisis LT $\gamma\delta$  CD4/CD8.

La figura 5.4 (panel B) muestra una disminución significativa en las células T CD3+ $\gamma\delta$ , T CD3+CD8+ $\gamma\delta$  ( $p < 0,001$ ), en pacientes con CC, respecto de los resultados obtenidos en los controles.

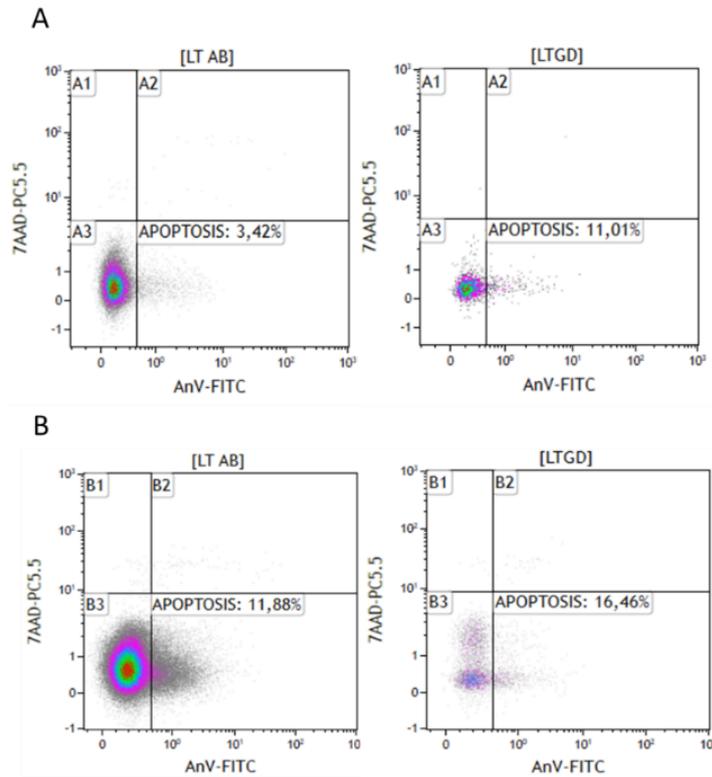




**Fig.5.4. Frecuencia de subpoblaciones de células T,  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (panel A y B) en sangre periférica de cáncer de colon (CC) vs sujetos sanos (control).** Se muestran los valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (Mann Whitney U Test). (\* $p < 0.001$ ). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  DE (Barras T).

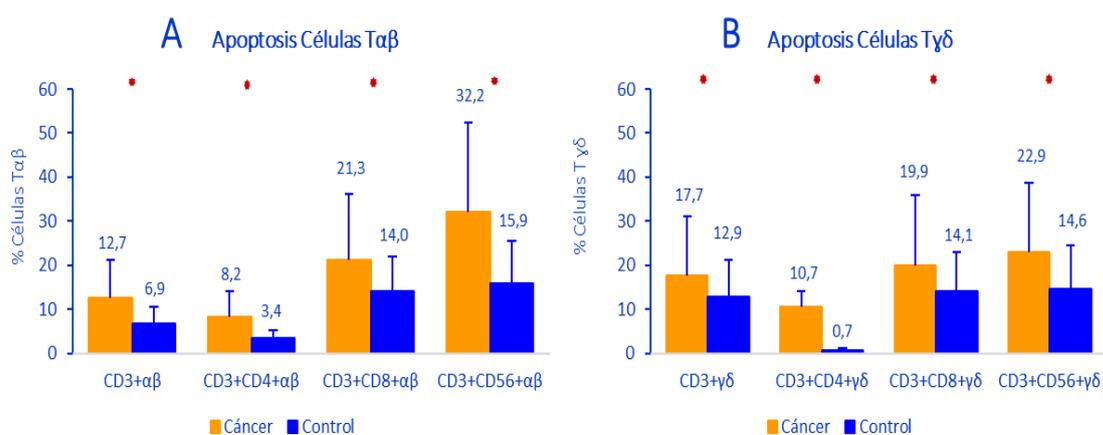
### 5.3 Apoptosis de las subpoblaciones linfocitarias $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ .

La figura 5.5 muestra los histogramas Anexina V/7AAD, reflejando el porcentaje de células en apoptosis de las subpoblaciones LT $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , donde se observa una clara diferencia entre la apoptosis en voluntarios sanos (panel A) vs pacientes (panel B).



**Fig.5.5 Apoptosis en voluntarios sanos (A) vs pacientes con CC (B) en las subpoblaciones celulares  $LT\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ . Se muestran los porcentajes de apoptosis.**

En la figura 5.6 vemos como la apoptosis se incrementó significativamente en todas las subpoblaciones de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  en pacientes con CC vs sujetos sanos.



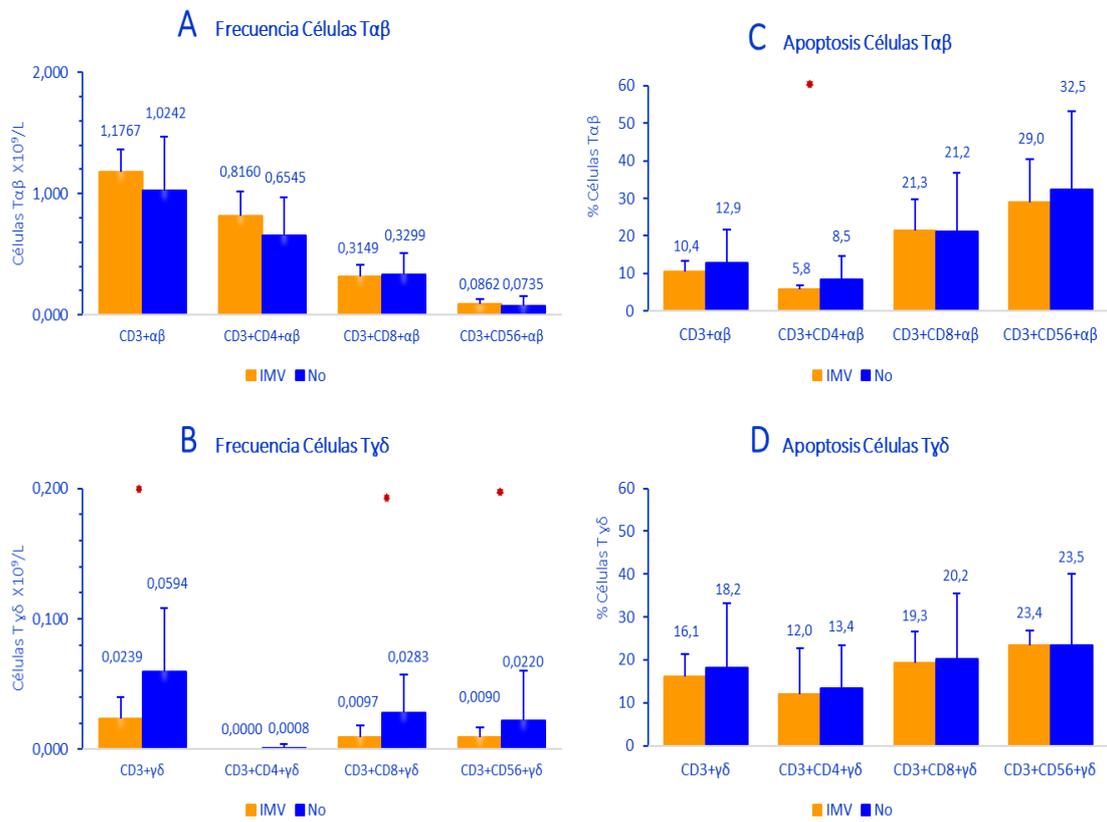
**Fig.5.6. Apoptosis de subpoblaciones de células T,  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (panel A y B) en sangre periférica de cáncer de colon (CC) vs sujetos sanos (control).** Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (Mann Whitney U Test). (\* $p < 0.001$ ). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  DE (Barras T).

#### 5.4 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis en pacientes de CC con infiltración tumoral microvascular en tejidos.

La figura 5.7 muestra las frecuencias de las subpoblaciones de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (panel A y B) y su apoptosis (panel C y D), en sangre periférica de 7 pacientes con CC que sufren infiltración microvascular (IMV), frente a pacientes con CC sin infiltración microvascular.

Se observaron diferencias significativas en el caso de las células T  $\gamma\delta$  (CD8+ y CD56+) (panel B). Los pacientes con infiltración vascular tenían frecuencias más bajas de células T  $\gamma\delta$  (CD8+ y CD56+), que pacientes sin infiltración vascular.

En cuanto a la apoptosis, se observa una diferencia significativa en el subconjunto de células CD3+CD4+ $\alpha\beta$  (panel C), mientras que no se observaron cambios en las apoptosis de ninguna de las subpoblaciones de células T  $\gamma\delta$ .



**Fig.5.7. Infiltración tumoral microvascular. Frecuencia de subpoblaciones de células T,  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (panel A y B) y apoptosis (panel C y D).** Se muestran los porcentajes de apoptosis y valores absolutos de las células. Pacientes con cáncer de colon según la infiltración tumoral microvascular (IMV) en tejidos (n = 7). Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). (\*p <0,05). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  DE (Barras T).

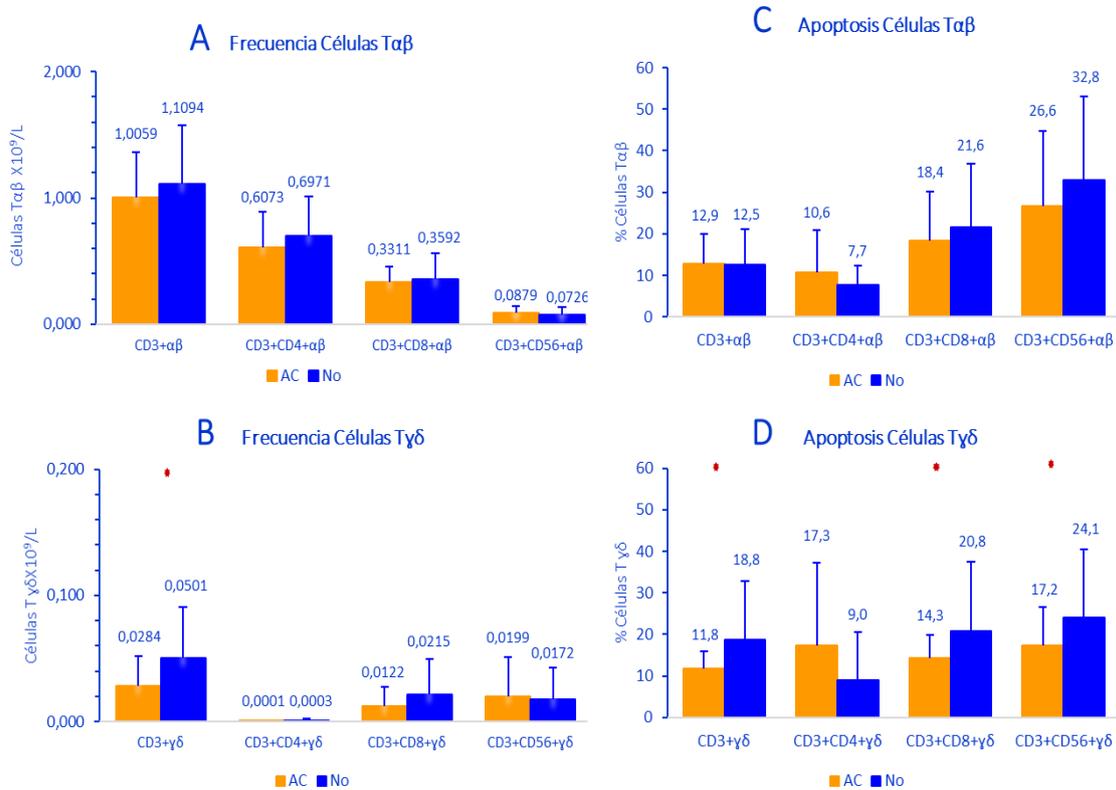
### 5.5 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis en pacientes con antecedentes de cáncer (AC).

Las frecuencias y apoptosis de las distintas subpoblaciones de linfocitos T se han analizado en 15 pacientes con CC que previamente habían tenido cáncer, (CC + AC) (6 de próstata, 5 de colon, 1 de mama, 1 de endometrio, 1 de leucemia, 1 de insulinoma), figura 5.9. La edad media en ambos grupos fue algo diferente,  $74,8 \pm 9,9$  años en CC + AC vs  $68,5 \pm 11,5$  años en pacientes CC sin AC ( $p = 0,042$ ).

La frecuencia de la subpoblación  $CD3+\gamma\delta$  es significativamente más baja en pacientes con CC y AC que las observadas en pacientes con CC que no tenían AC (Figura 5.9, panel B). Los pacientes con CC + AC presentaron menor valor de  $CD8+\gamma\delta$ , aunque la diferencia no fue significativa ( $p = 0,114$ ), teniendo en cuenta que un elevado porcentaje de las  $CD3+\gamma\delta$ , en sangre periférica son  $CD3+CD4-CD8-\gamma\delta$  (doble negativo).

No se observaron diferencias en el caso de  $CD3+CD4+$  o  $CD3+CD56+\gamma\delta$ .

La apoptosis fue significativamente menor en las subpoblaciones  $\gamma\delta$  de pacientes con CC con AC frente a pacientes con CC sin AC ( $CD3+\gamma\delta$ ,  $CD3+CD8+\gamma\delta$  y  $CD3+CD56+\gamma\delta$ ) (Fig. 5.9, Panel D).

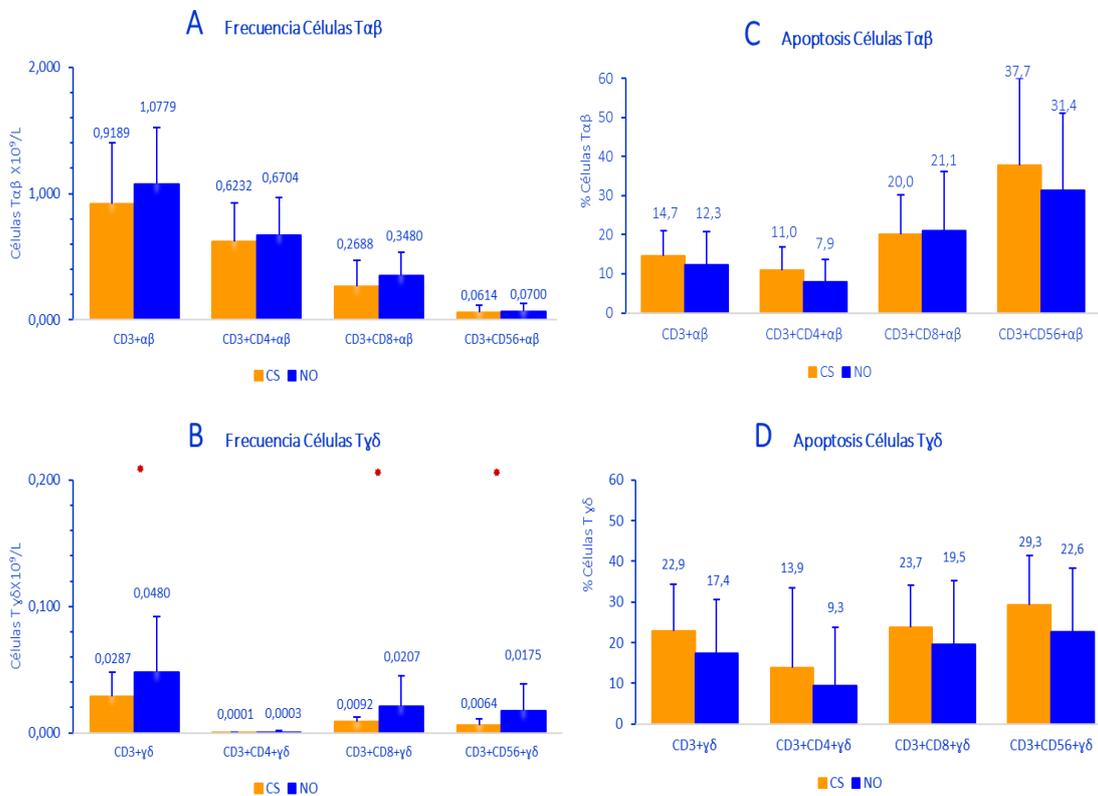


**Fig.5.8 Antecedente de cáncer. Frecuencia de subpoblaciones de células T, αβ y γδ (panel A y B) y apoptosis (panel C y D) en pacientes con cáncer de colon con antecedentes de cáncer (AC) (n = 15). Se muestran los porcentajes de apoptosis y valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). (\*p <0,05). Los resultados se expresan como medias ± DE (Barras T).**

### 5.6 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T αβ y γδ y apoptosis en pacientes con cáncer sincrónico (CS).

El paciente con cáncer sincrónico (CS) es aquel que presenta varios tumores malignos que ocurren simultáneamente. Cada tumor debe ser primario, lo que elimina la posibilidad de ser lesión metastásica del otro<sup>153</sup>.

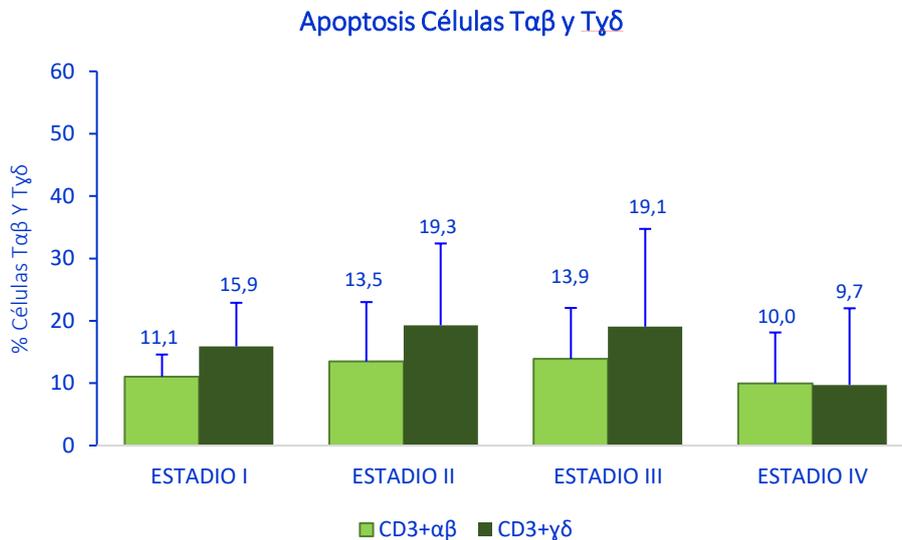
La figura 5.9 muestra la frecuencia de linfocitos T en siete pacientes con CC con cáncer sincrónico (CS) (5 de colon, 1 de mama, 1 de endometrio) en comparación con pacientes sin CS. Se observaron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a las células T  $\gamma\delta$  (CD3+  $\gamma\delta$ , CD3+CD8+  $\gamma\delta$  y CD3+CD56+  $\gamma\delta$ ) (panel B). No se observaron diferencias significativas en la apoptosis de subconjuntos de células T de pacientes con CC según la presencia o ausencia de CS.



**Fig.5.9 Cáncer sincrónico (CS). Frecuencia de subpoblaciones de células T,  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (panel A y B) y apoptosis (panel C y D) en sangre periférica en pacientes con cáncer de colon con cáncer sincrónico (CS) (n = 7).** Se muestran los porcentajes de apoptosis. Y valores absolutos de las células. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). (\*p <0,05). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  DE (Barras T).

### 5.7 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y apoptosis según estadio de cáncer en pacientes con cáncer de colon (CC).

En la figura 5.10 vemos como varía la apoptosis en las subpoblaciones de LT  $\alpha\beta$  y LT  $\gamma\delta$  dentro de los distintos estadios de cáncer. Vemos una tendencia de aumento más pronunciada de la frecuencia de la apoptosis de los LT  $\gamma\delta$  en los estadios II y III.

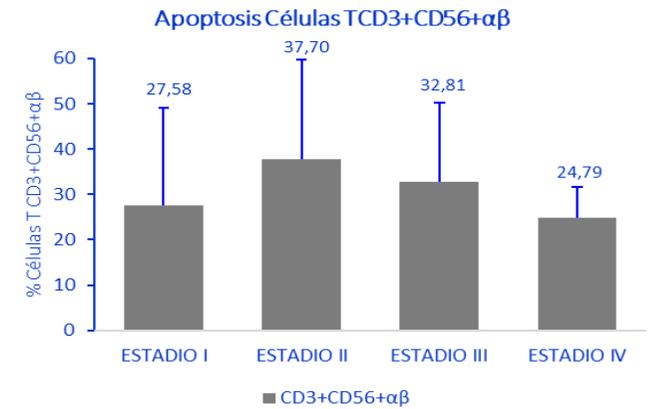
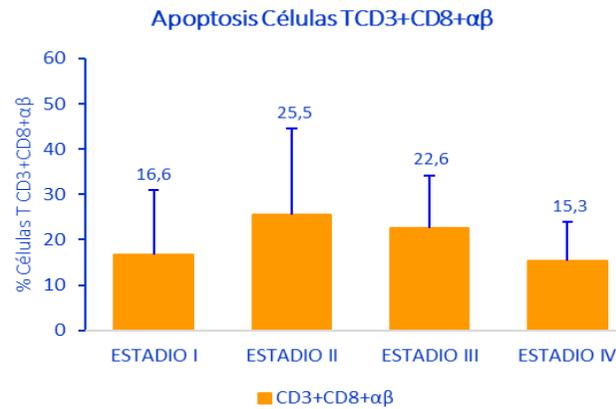
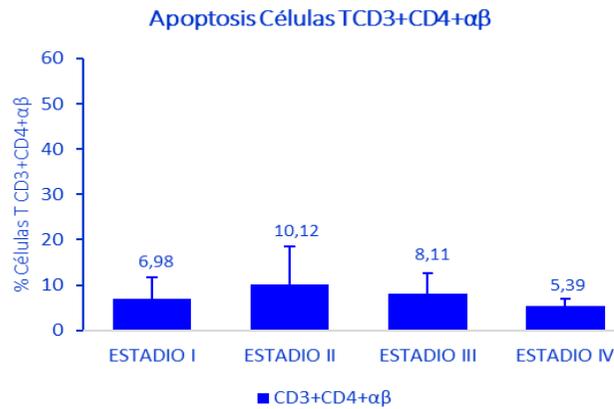
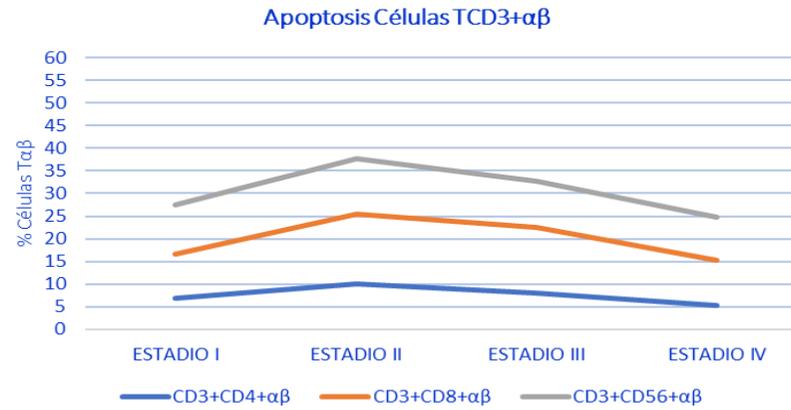


**Fig.5.10 Apoptosis de células T, según el estadio del cáncer.** Se muestran los porcentajes de apoptosis.

Dentro de las células T  $\alpha\beta$ , si hacemos el análisis por subpoblaciones vemos como en todas ellas la tendencia de aumento es más marcada en el estadio II (Figura 5.11).

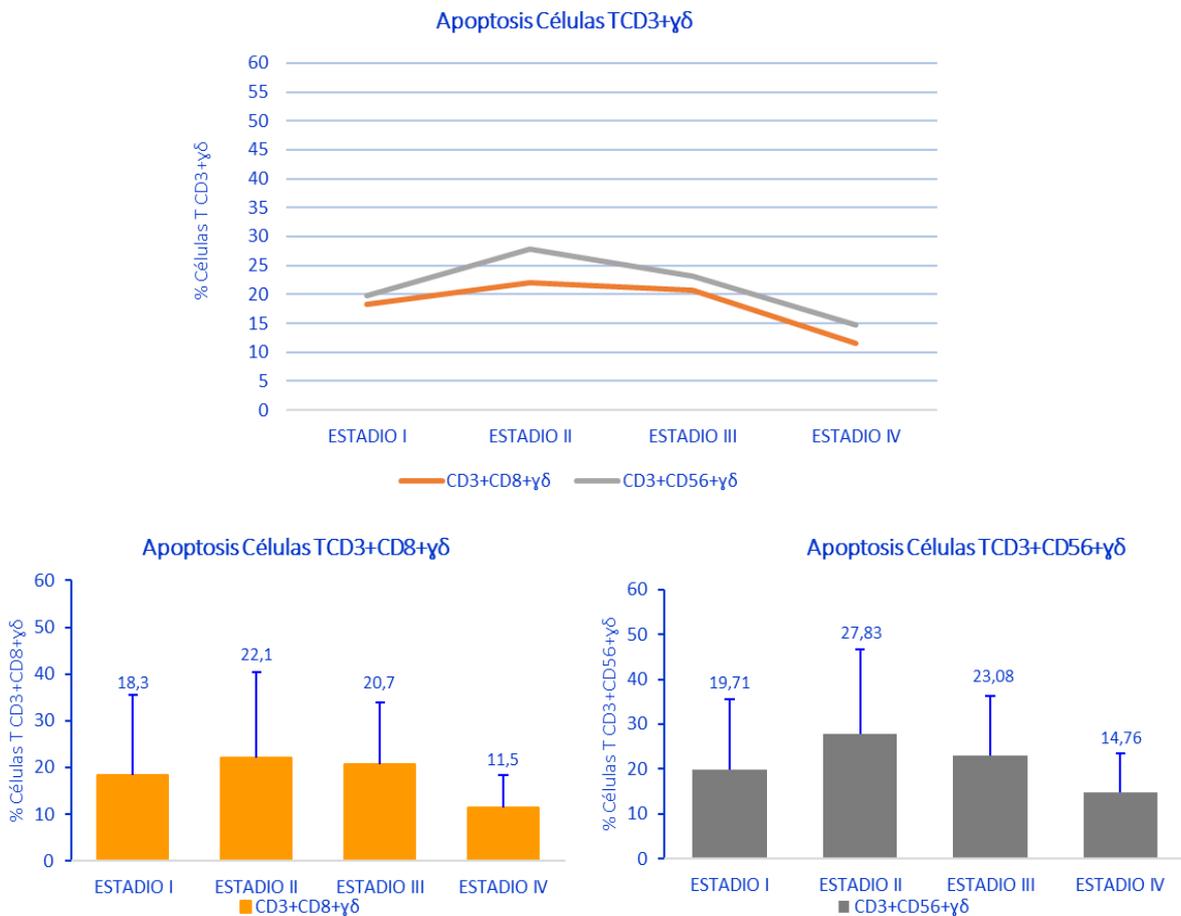
No encontramos diferencias significativas en la frecuencia de la apoptosis de las células T  $\alpha\beta$ , entre estadios.

RESULTADOS



**Fig.5.11 Apoptosis de las subpoblaciones de células T αβ, según el estadio del cáncer.** Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.

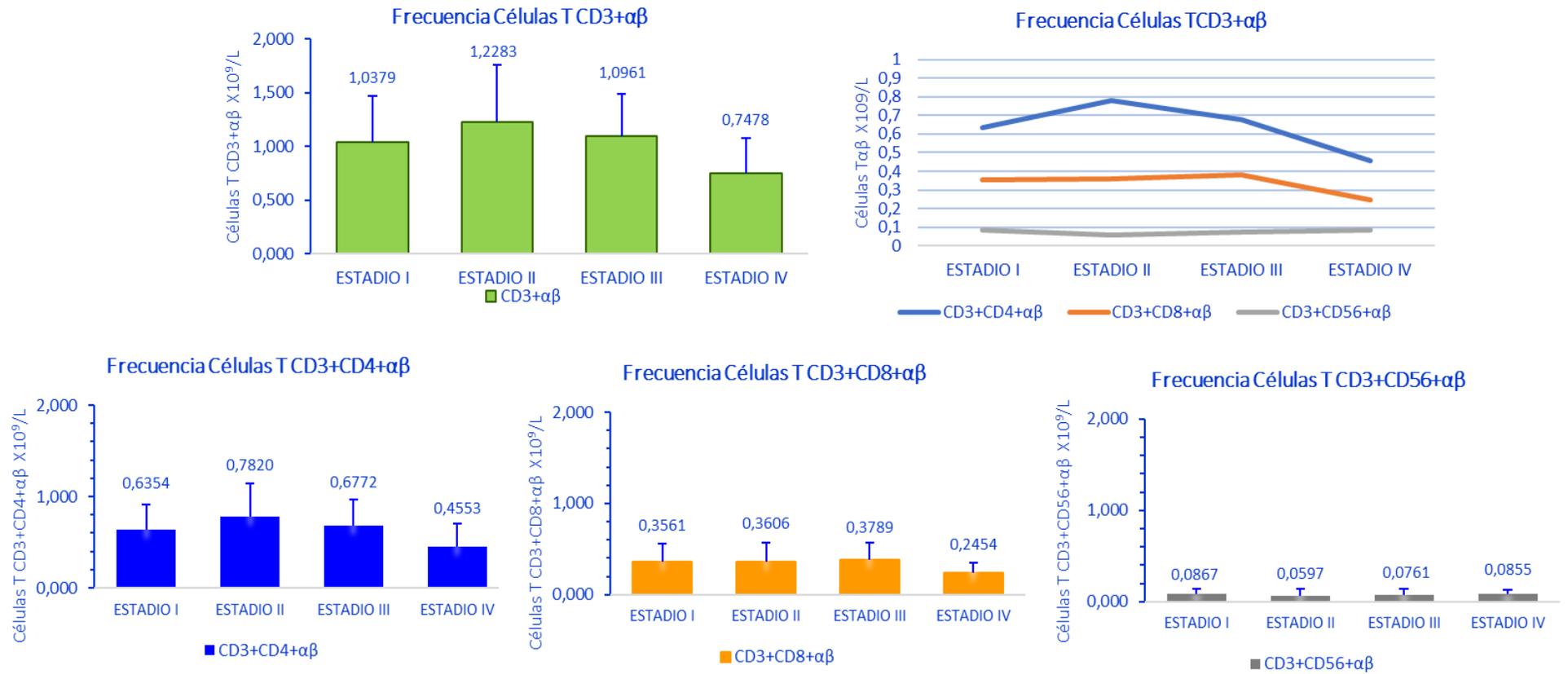
En lo que respecta a las células T  $\gamma\delta$ , si hacemos el análisis de la apoptosis por subpoblaciones, no encontramos diferencias significativas. Vemos en la figura 5.12 en ambas subpoblaciones CD3+CD8+ $\gamma\delta$  y CD3+CD56+ $\gamma\delta$  un incremento de la frecuencia en los estadios II y III. Siendo la tendencia más marcada en las células T CD3+CD56+ $\gamma\delta$  en el estadio II.



**Fig.5.12 Apoptosis de subpoblaciones de células T  $\gamma\delta$ , según el estadio del cáncer.** Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.

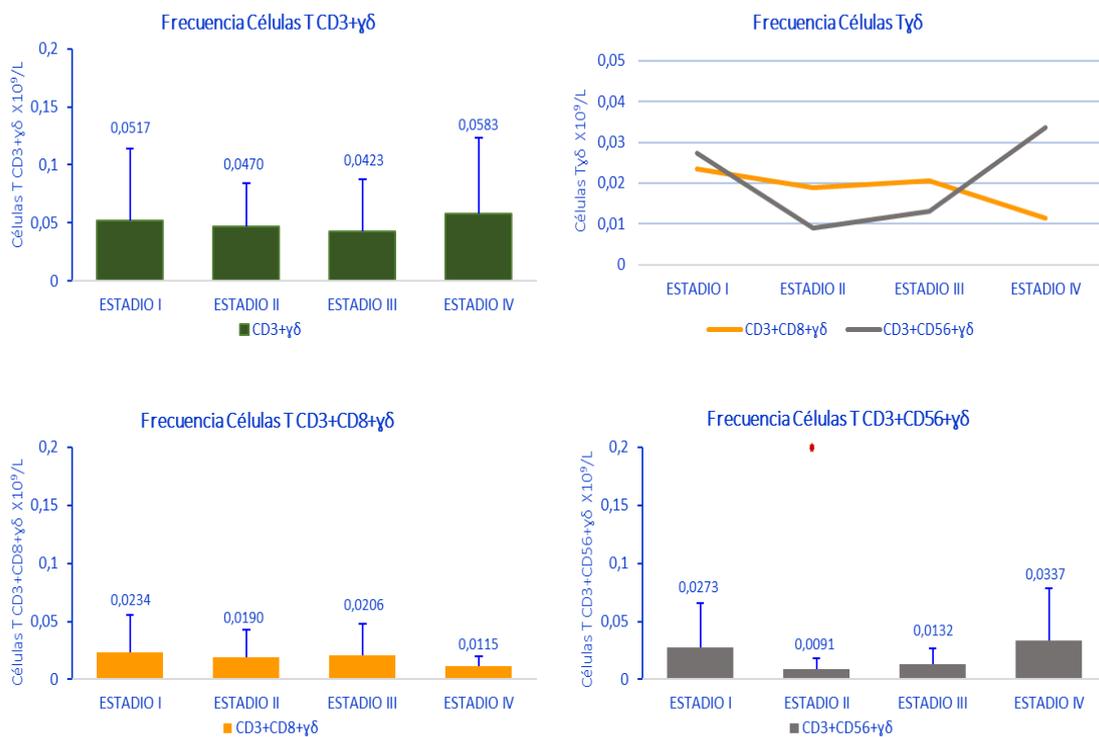
Si analizamos las frecuencias de las subpoblaciones de LT  $\alpha\beta$ , según los diferentes estadios del cáncer, no encontramos diferencias significativas (Fig.5.13).

RESULTADOS



**Fig.5.13 Frecuencia de subpoblaciones de células T  $\alpha\beta$ , según el estadio del cáncer.** Se muestran los valores absolutos de las células. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney).  $p=ns$ .

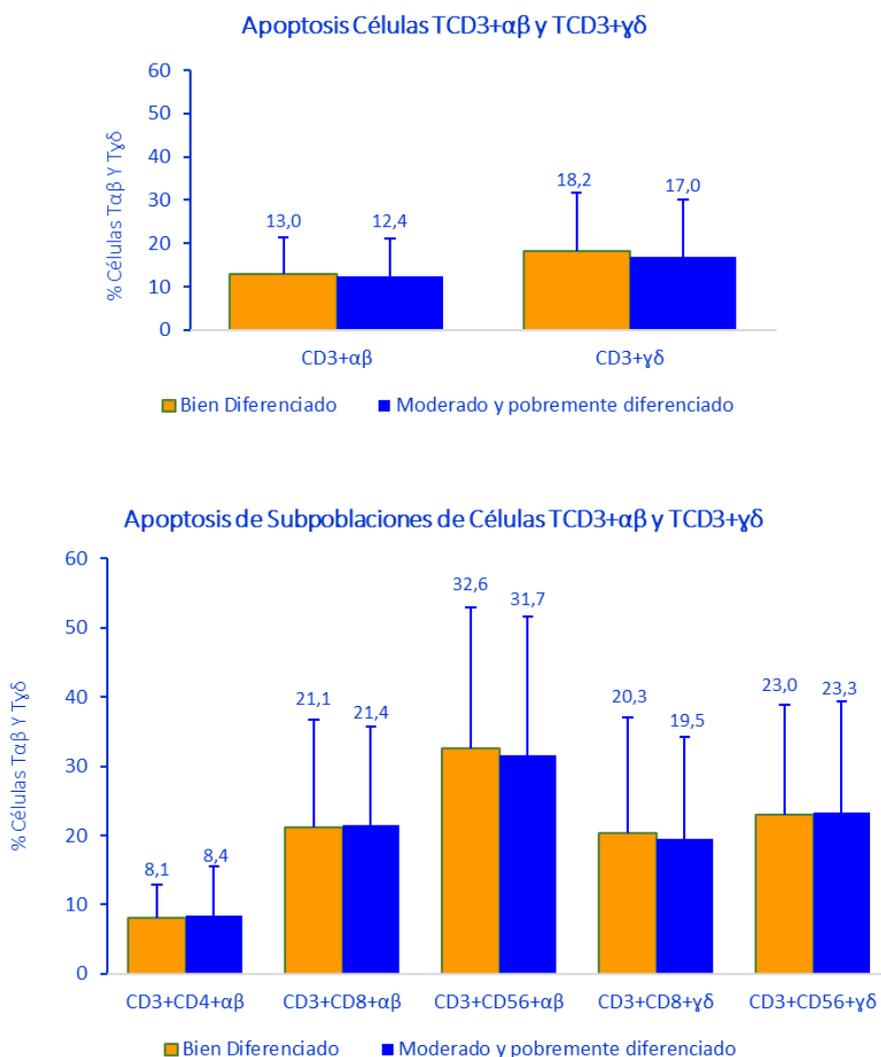
La figura 5.14 muestra la frecuencia de las distintas subpoblaciones de células T CD3+ $\gamma\delta$  en los distintos estadios de cáncer. Encontramos una diferencia significativa en la subpoblación CD3+CD56+ $\gamma\delta$ . Los pacientes que se encuentran en estadio II presentan unos valores absolutos significativamente inferiores a los pacientes que se encuentran en estadio I.



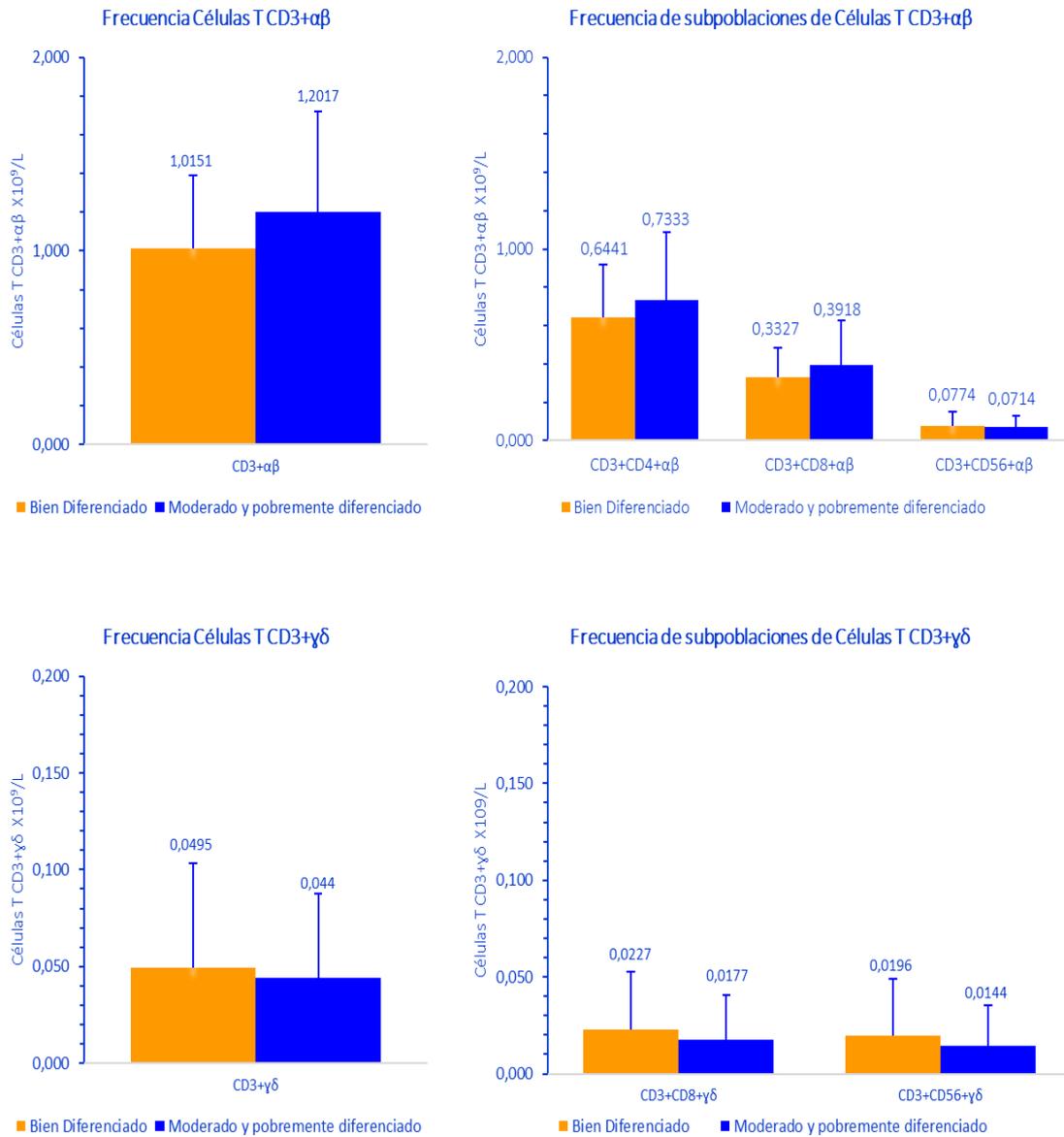
**Fig.5.14 Frecuencia de subpoblaciones de células T  $\gamma\delta$ , según el estadio del cáncer. Se muestran los valores absolutos de las células. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). (\*p <0,05).**

5.8 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  y apoptosis según el grado de diferenciación del tumor en pacientes con cáncer de colon (CC).

Como se observa en la figura 5.15 y 5.16, al agrupar los tumores en bien diferenciados frente a los moderada y pobremente diferenciados, no observamos diferencia significativa en la apoptosis, ni en la frecuencia de las subpoblaciones de LT  $\alpha\beta$  y LT  $\gamma\delta$ .



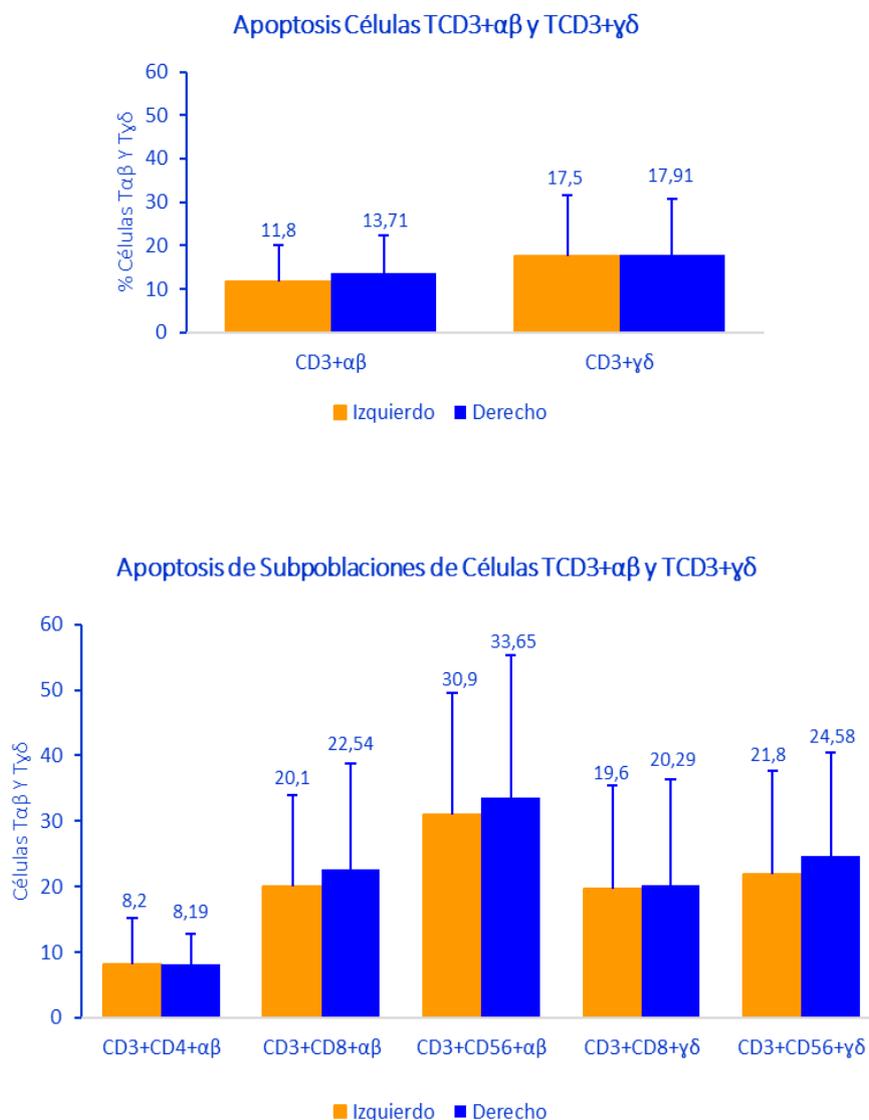
**Fig.5.15 Apoptosis de células T, según el grado de diferenciación del tumor.** Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.



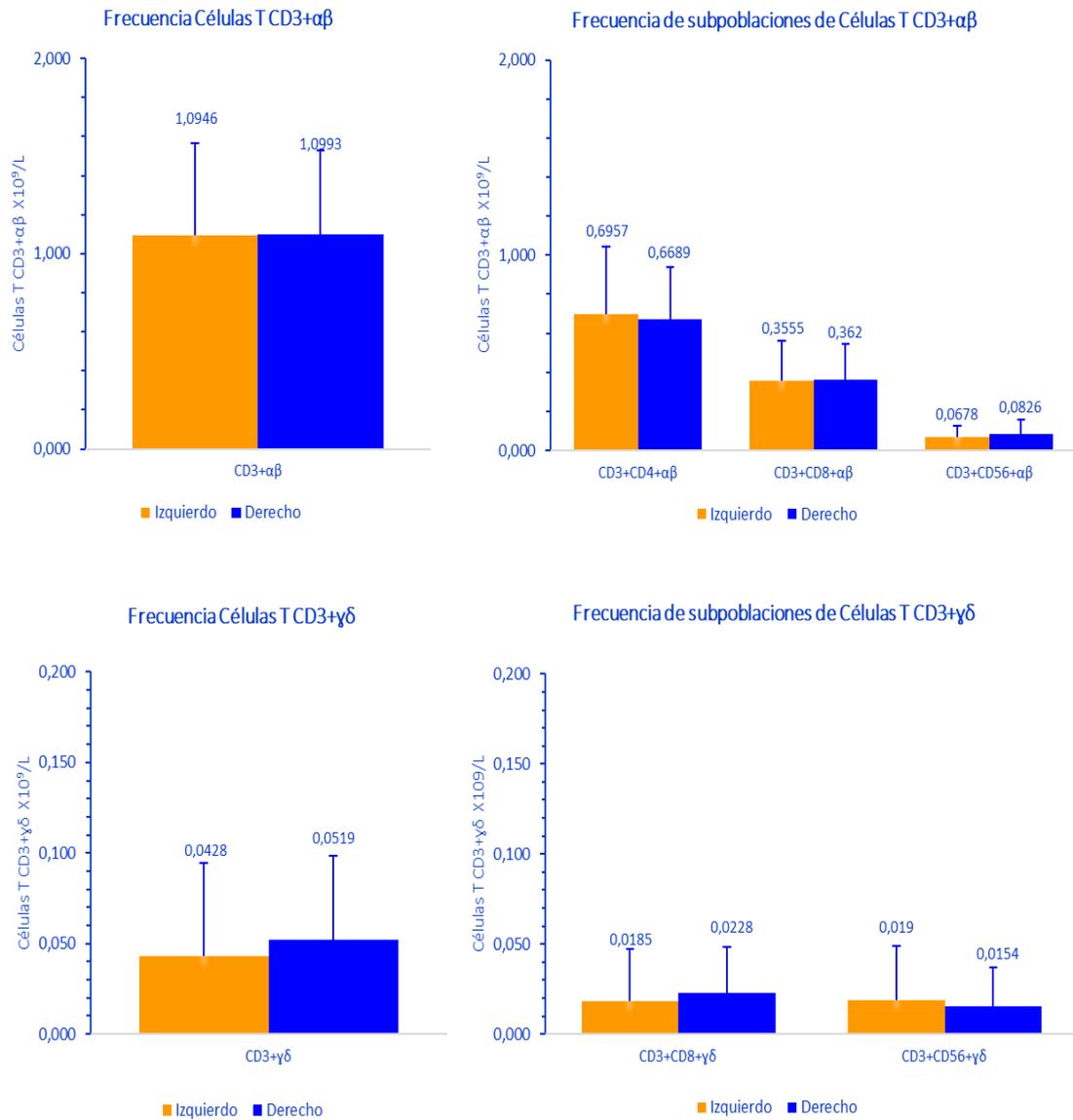
**Fig.5.16 Frecuencia de células T, según el grado de diferenciación del tumor.** Se muestran los valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.

5.9 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  y apoptosis según la localización anatómica del tumor en pacientes con cáncer de colon (CC).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la apoptosis (figura 5.17) y frecuencia de subpoblaciones de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  (figura 5.18) al agrupar a los pacientes según la localización del tumor, en colon izquierdo o derecho.



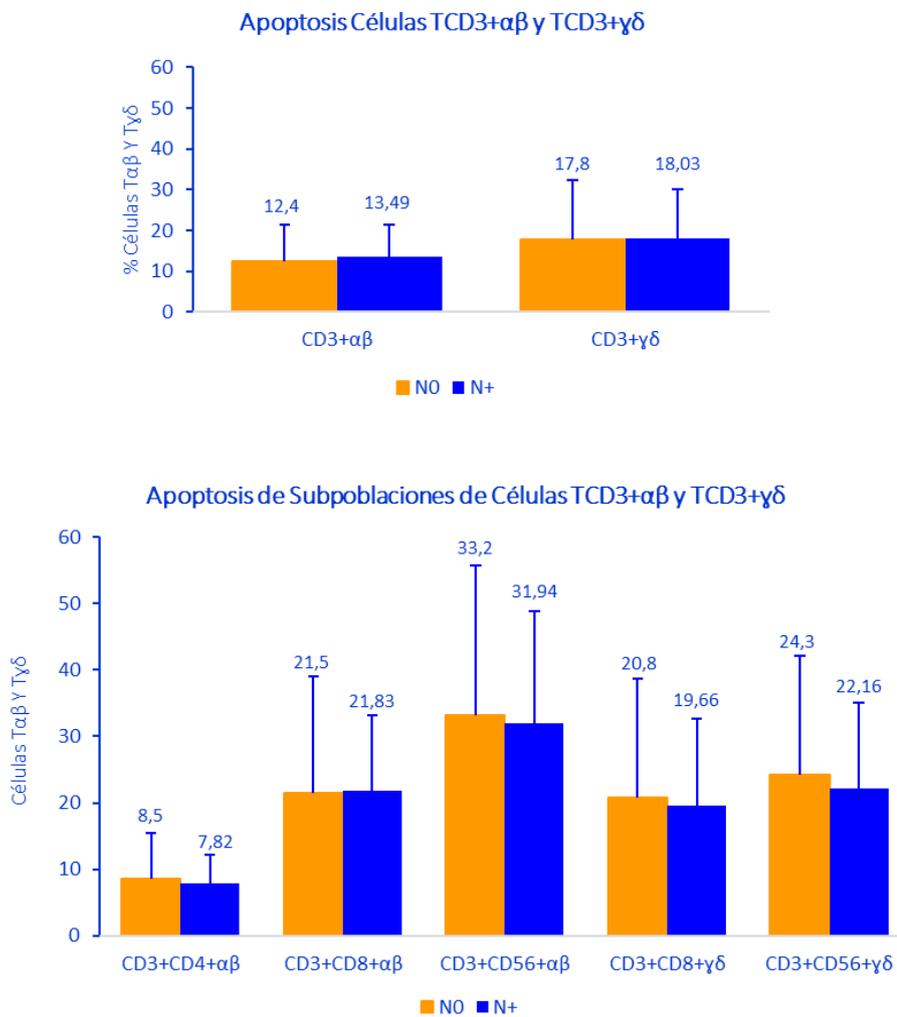
**Fig.5.17 Apoptosis de células T, según la localización anatómica del tumor.** Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.



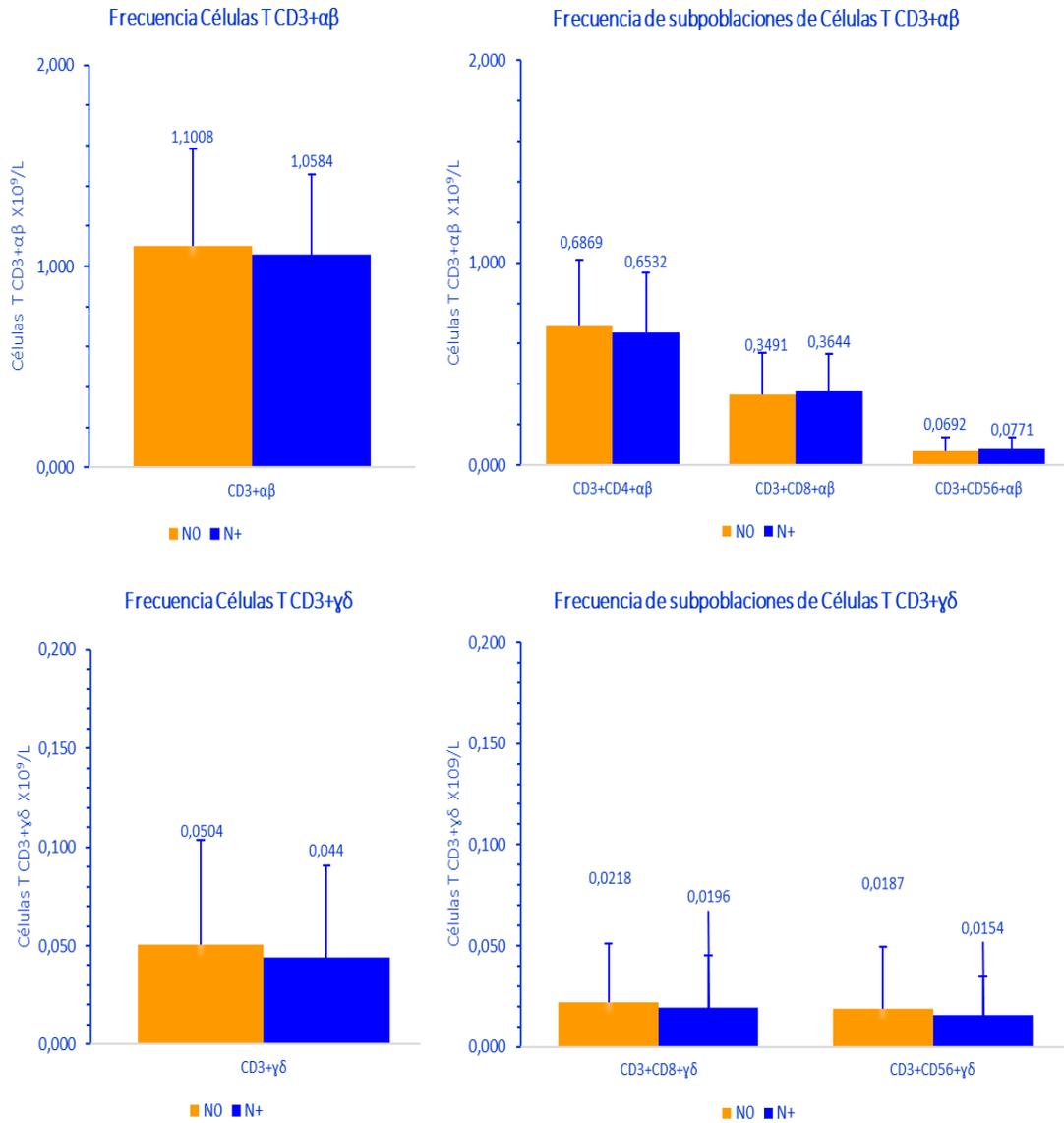
**Fig.5.18 Frecuencia de células T, según la localización anatómica del tumor.** Se muestran los valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.

5.10 Relación de frecuencia de subpoblaciones de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  y apoptosis según la presencia de afectación ganglionar en pacientes con cáncer de colon (CC).

En la figura 5.19 y 5.20, vemos como al agrupar los pacientes según la presencia de afectación ganglionar, no observamos diferencias significativas en la apoptosis, ni en los valores absolutos de las subpoblaciones de LT  $\alpha\beta$  y LT  $\gamma\delta$ .



**Fig.5.19 Apoptosis de células T, según la presencia de afectación ganglionar.** Se muestran los porcentajes de apoptosis. Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.



**Fig.5.20 Frecuencia de células T, según la presencia de afectación ganglionar.** Se muestran los valores absolutos de las células Prueba no paramétrica (prueba U de Mann-Whitney). p=ns.

## 6. DISCUSIÓN



## 6 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con nuestra hipótesis inicial en la que se esperaba encontrar diferencias en las frecuencias y en la apoptosis de los linfocitos en pacientes con cáncer colon, respecto a los voluntarios sanos. El cáncer de colon progresa a través de mecanismos patológicos basados entre otros en el escape inmunitario de las células cancerígenas y a la inmunosupresión, entre otros.

Nuestro trabajo es el primero en demostrar una disminución de los  $LT\gamma\delta$  y un aumento de la apoptosis en todas las subpoblaciones linfocitarias T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  en sangre periférica en pacientes de cáncer de colon, lo que indica cierto grado de inmunodeficiencia frente a voluntarios sanos.

Hemos trabajado con una amplia muestra que consta de 144 sujetos de los que 96 son pacientes con CC apareados por sexo y edad con sus respectivos 48 controles, lo que nos ha permitido estudiar en profundidad la frecuencia y apoptosis en las subpoblaciones linfocitarias  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , tratándose por tanto de una muestra equilibrada.

### **Diferencias de parámetros analíticos**

De las diferencias obtenidas en la distribución de parámetros analíticos, mediante una hematimetría básica, como el recuento de linfocitos, neutrófilos y plaquetas encontradas entre pacientes y controles, confirmamos la compleja interacción entre los parámetros sanguíneos, los estados inflamatorios y la propia inmunovigilancia a nivel sistémico, siendo imprescindible un adecuado funcionamiento de la inmunovigilancia frente al desarrollo de neoplasias<sup>154</sup>.

La progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer está determinada no solo por las características del tumor, sino también por la respuesta inflamatoria del

paciente<sup>155</sup>. Una respuesta inflamatoria elevada se asocia con un mal pronóstico, independientemente del estadio del tumor<sup>156,157</sup>.

La respuesta inflamatoria está representada por los niveles séricos de neutrófilos, linfocitos, plaquetas y proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva y la albúmina<sup>158</sup>.

En un estudio previo observaron como las células de cáncer colorrectal secretan un factor estimulante de colonias de granulocitos y que se reclutan neutrófilos en el sitio del tumor<sup>159</sup>. Varias de las células del microambiente producen mediadores capaces de reclutar diferentes poblaciones de leucocitos desde la circulación hacia el sitio del tumor<sup>160</sup> y otras son capaces de secretar sustancias quimiotácticas de neutrófilos<sup>161</sup>.

Los neutrófilos y las proteinasas favorecen la proliferación tumoral, la invasión local, la angiogénesis y la vascularización tumoral, promoviendo la metástasis. Por lo tanto, el aumento de neutrófilos puede promover el crecimiento tumoral y la metástasis.<sup>162</sup>

La linfopenia previa al tratamiento se ha propuesto como un marcador de la inmunosupresión inducida por el cáncer, que altera la activación de los linfocitos, promueven el reclutamiento de células T reguladoras supresoras y activa la vía extrínseca de la apoptosis, lo que finalmente altera la homeostasis de los linfocitos<sup>163</sup>.

En estudios previos se ha propuesto que la proporción de neutrófilos frente a linfocitos (NLR, por sus siglas en inglés neutrophil-to-lymphocyte ratio), refleja el equilibrio entre la inflamación protumoral y la función inmune antitumoral<sup>164</sup>.

Un NLR elevado puede ser el resultado de un aumento de neutrófilos o una disminución de linfocitos o ambos. En el microambiente tumoral, una mayor concentración de neutrófilos promueve el crecimiento del tumor, mientras que una menor concentración de linfocitos indica un control local ineficaz del tumor. Por lo tanto, un NLR microambiental aumentado puede indicar progresión tumoral, lo que representa un marcador de pronóstico sombrío. Dado que todos los artículos publicados hasta el momento coinciden en que un NLR sérico alto es un indicador de pronóstico desfavorable, postulan que el NLR sérico refleja de manera indirecta pero precisa el proceso de inflamación intratumoral<sup>162</sup>.

En lo que respecta al recuento de plaquetas, en estudios previos, se ha establecido en varios tipos de tumores sólidos el vínculo entre la trombocitosis, el mal pronóstico y el tiempo de supervivencia más corto, incluidos el cáncer de mama, pulmón, colon, gástrico y de ovario<sup>165</sup>.

Tanto el tumor como las células huésped asociadas, como los leucocitos y las plaquetas, pueden producir citocinas y quimiocinas inflamatorias, lo que contribuye a la progresión maligna<sup>166</sup>. Aunque una variedad de citocinas está implicada en la respuesta inflamatoria, destaca la IL6 que estimula la diferenciación de megacariocitos en plaquetas y participa en el reclutamiento de neutrófilos<sup>167,168</sup>.

El cociente plaquetas/linfocitos (PLR, por sus siglas en inglés platelet-to-lymphocyte ratio) se ha estudiado como biomarcador pronóstico. Se ha planteado la hipótesis de que un PLR aumentado es indicativo de una respuesta inflamatoria aumentada, asociada con características tumorales más agresivas<sup>169</sup>.

En nuestro recuento vemos como los pacientes con CC, en comparación con los sujetos del grupo control, presentaron niveles superiores, estadísticamente significativos, en parámetros habitualmente relacionados con procesos inflamatorios: un mayor recuento de neutrófilos y plaquetas.

### **Disminución en la frecuencia de los LT $\gamma\delta$ en pacientes con CC**

De los resultados obtenidos de los análisis realizados por citometría de flujo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos vemos una clara disminución de los porcentajes de LT $\gamma\delta$ , en los pacientes con CC respecto a los encontrados en voluntarios sanos, mientras que en el resto de subpoblaciones no encontramos diferencia significativa.

Nuestro grupo previamente estudió la influencia inmunológica de los LT  $\gamma\delta$  en otras patologías. En un estudio prospectivo en 40 pacientes con la enfermedad de Crohn, enfermedad crónica, inflamatoria y recidivante, que afecta principalmente al intestino delgado y grueso, tanto los niveles de LT  $\gamma\delta$  como los  $\alpha\beta$  fueron más bajos en pacientes,

Esta disminución era más evidente en los LT  $\gamma\delta$ , especialmente en la subpoblación de LT CD8+  $\gamma\delta$ . Estos resultados respaldaron la teoría de que en pacientes con la enfermedad de Crohn está presente una alteración compleja de las respuestas inmunitarias que afecta el número total y la función de las células T  $\gamma\delta$ <sup>170</sup>.

En otro estudio prospectivo de 102 pacientes en comparación con 102 sujetos sanos, se demostró una relación entre bajos niveles de LT $\gamma\delta$  con el riesgo de recaída y las formas graves de la enfermedad. Los pacientes con déficit de LT $\gamma\delta$  fueron más propensos a la cirugía que los pacientes sin este déficit. Estos resultados sugieren que las células T  $\gamma\delta$  podrían utilizarse como marcadores de mal pronóstico de la enfermedad de Crohn tras el diagnóstico de esta patología que se ha relacionado con la evolución a CC<sup>148</sup>.

Se ha señalado que pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal presentan un mayor riesgo de desarrollar neoplasias<sup>171</sup>. Existe un mayor riesgo de desarrollar CCR en pacientes con colitis ulcerosa y un mayor riesgo de desarrollar carcinoma del intestino delgado en pacientes con la enfermedad de Crohn<sup>172</sup>. Ambas enfermedades tienen en común la deficiencia de LT  $\gamma\delta$ .

La importante función antitumoral de los LT $\gamma\delta$ , en sangre periférica, se ha puesto de manifiesto en estudios en otros tumores y enfermedades, al encontrar una disminución de los LT $\gamma\delta$  frente a los encontrados en gente sana.

En un estudio reciente, publicado en 2020, en el que incluyeron a 138 mujeres con cáncer de mama y 50 controles, encontraron, antes de la cirugía, una proporción inferior de LT $\gamma\delta$  en sangre periférica, frente a los encontrados en voluntarios sanos. Dicha proporción aumentaba después de la intervención, pero seguía siendo menor que en las voluntarias sanas<sup>173</sup>.

En otro estudio donde se analizaba las frecuencias de las poblaciones de células B y T, tanto  $\alpha\beta$  como  $\gamma\delta$ , en sangre periférica de 135 pacientes con sepsis frente a un grupo control de sujetos sanos, y las frecuencias de las poblaciones de linfocitos con respecto a los diferentes estadios de la enfermedad (sepsis, sepsis grave y shock séptico) y la relación de estos subgrupos con la mortalidad, se observó cómo los LT $\gamma\delta$  muestran la mayor disminución y esta reducción se vuelve más intensa cuando el proceso séptico se

vuelve más severo. La mortalidad se asoció también con una disminución significativa de las células T  $\gamma\delta$ <sup>174</sup>.

Las células T  $\gamma\delta$  poseen una amplia plasticidad funcional tras reconocer células infectadas o transformadas.

Varios estudios recientes han aportado evidencia de que los LT $\gamma\delta$  no siempre se asocian con un buen pronóstico en algunos cánceres sólidos. De hecho, además de sus funciones antitumorales, los LT $\gamma\delta$  se han asociado con funciones protumorales, ya sea directamente a través de mecanismos de inmunosupresión o indirectamente al favorecer el establecimiento de un entorno inmunosupresor mediante el reclutamiento de células supresoras.

Recientemente se ha identificado presencia en tumores de mama una población de células T  $\gamma\delta$  supresoras que expresa CD73, produce IL-10 y adenosina<sup>175,176</sup>.

Los LT $\gamma\delta$  Th17 a través de la producción de interleucina IL-17 muestran funciones protumorales en el CCR<sup>177-180</sup>. Por el contrario, en otros cánceres, las células productoras de IL-17 pueden tener funciones antitumorales<sup>181</sup>.

En algunas infecciones, como por el ejemplo la producida por el citomegalovirus humano se produce una expansión clonal de células T  $\gamma\delta$  periféricas<sup>182</sup>.

En hallazgos previos de diferentes líneas de investigación se comprobó como diversas enfermedades humanas se asocian con una proliferación selectiva de LT $\gamma\delta$  en sangre. En un estudio se comprobó el aumento de LT $\gamma\delta$  en pacientes con tuberculosis y en individuos sanos que estaban en contacto con pacientes con tuberculosis<sup>183</sup>.

En otro estudio se observó como la cantidad de LT $\gamma\delta$  era mayor en los períodos "silenciosos" de la enfermedad celíaca donde la patología era más leve, lo que sugiere que estas células pueden ayudar a suprimir las reacciones autoinmunes<sup>184</sup>.

Estos resultados sugieren que las células T  $\gamma\delta$  pueden desempeñar un papel temprano en la vigilancia inmunitaria del huésped.

Lo que conduce a una teoría actual de que las células T  $\gamma\delta$  pueden representar una forma más primitiva de vigilancia, que evolucionó para reconocer las señales de "estrés" presentadas por las células dañadas al principio de las enfermedades. Esta teoría del estrés

es atractiva porque sirve para unificar las diversas funciones asociadas con las células T  $\gamma\delta$  y proporciona una explicación racional de cómo estas pueden complementar las funciones efectoras de las células T  $\alpha\beta$ <sup>185</sup>.

La proliferación de lo LT $\gamma\delta$ , depende de un equilibrio entre señales coestimuladoras e inhibitoras.

En pacientes con carcinoma nasofaríngeo se vio como a pesar de que no encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los LT $\gamma\delta$  en sangre periférica entre pacientes y voluntarios sanos, sí que se vio afectada la capacidad de los LT $\gamma\delta$  de pacientes de producir IL2, respecto a los sujetos sanos, del mismo modo que se observó que en pacientes los LT $\gamma\delta$  eran menos citotóxicos. Situación que se revirtió tras la extirpación del tumor por intervención quirúrgica. Estos resultados indicaban que en los pacientes de cáncer nasofaríngeo prevalece la tolerancia inmunológica que restringe la actividad, el estado y la proliferación de lo LT $\gamma\delta$ , lo que hace pensar que todo ello depende de un equilibrio entre señales coestimuladoras e inhibitoras<sup>185</sup>.

La necesidad de este equilibrio también se evidencia en el reciente estudio que hemos publicado, donde se relaciona la presencia de anticuerpos anti-Anisakis simplex y niveles de interleucina-7 (IL-7). La IL-7, que es una citocina importante, que juega un papel importante en la expansión de los LT $\gamma\delta$ . En aquellas personas que presentaban una menor frecuencia de LT $\gamma\delta$  se observa una mayor producción de IL-7 para intentar recuperar estos valores de homeostasis de los LT $\gamma\delta$ <sup>186</sup>.

El equilibrio entre las diferentes señales coestimuladoras e inhibitoras también puede desencadenar LT $\gamma\delta$  circulantes con un fenotipo de disfunción notable.

En humanos, los dos principales subtipos de LT $\gamma\delta$  se caracterizan por la cadena  $\delta$ . La población de V $\delta$ 1 reside principalmente en el intestino, mientras que la población de V $\delta$ 2 predomina en la sangre periférica.

En pacientes con cáncer hepatocelular observaron cómo los LT $\gamma\delta$  circulantes revelaron un fenotipo de disfunción notable.

Se ha visto en estos pacientes un desequilibrio en la relación  $V\delta 1^+ / V\delta 2^+$ , donde se ve un aumento de la población  $V\delta 1$  en sangre periférica, mientras que la población  $V\delta 2$  disminuye al compararla con voluntarios sanos.

La proporción sorprendentemente elevada de la  $V\delta 1^+$  versus el subconjunto  $V\delta 2^+$  sugirió que la relación  $V\delta 1^+ / V\delta 2^+$  sería un biomarcador potencial para el diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer hepatocelular<sup>187</sup>.

Así este equilibrio sería el responsable de las discrepancias encontradas entre diferentes trabajos en los que en unos se observa un aumento y en otra disminución de la frecuencia los  $LT\gamma\delta$  en sangre periférica de pacientes de estudios de distintas enfermedades de tipo gastrointestinal, autoinmunes y diferentes tipos de cáncer, respecto a voluntarios sanos<sup>188,189</sup>.

Equilibrio que dependería del tipo y estadio de la enfermedad y del motivo de las disfunciones de las subpoblaciones de  $LT\gamma\delta$ <sup>189</sup>.

En nuestro estudio, los pacientes con CC tienen alrededor de un 50% menos de  $LT\gamma\delta$  que los voluntarios sanos lo cual puede tener varias explicaciones.

- Podría ser que las propias células tumorales hayan promovido la inmunodeficiencia, siendo las  $LT\gamma\delta$  las más afectadas.

En un estudio recientemente realizado en pacientes con carcinoma hepatocelular, vieron como el porcentaje de los  $LT V\delta 2^+ \gamma\delta$  circulantes en sangre periférica se redujo significativamente.

Observaron en pacientes, una pérdida de capacidad de proliferación de los  $LT\gamma\delta$ , encontrando altas expresiones de moléculas de punto de control inhibitorio<sup>187</sup>. La expresión génica relacionada con el ciclo celular indicó una regulación negativa de los reguladores positivos del ciclo celular y una regulación positiva de genes relacionados con la detención del ciclo celular. Identificaron una pérdida de diversidad de los TCR en los pacientes y una regulación positiva de los genes relacionados con la apoptosis, de modo que propusieron la hipótesis de que las células T citotóxicas  $V\delta 2^+ \gamma\delta$  se agotan

selectivamente mediante la estimulación crónica por parte de los antígenos de las células tumorales y a través de la apoptosis inducida por activación<sup>190</sup>.

- Otra explicación posible es que los pacientes con CC tengan una inmunodeficiencia previa de  $LT\gamma\delta$  que haya propiciado la carcinogénesis, lo que iría relacionado con el hecho de que hemos observado como los pacientes con CC que previamente han padecido cáncer tienen el 50% de  $LT\gamma\delta$  que los pacientes que no tienen antecedentes de cáncer (AC) y un 25% respecto de los voluntarios sanos.

Esta diferencia entre los pacientes que han padecido AC y los que no, podría indicar que la inmunodeficiencia de  $LT\gamma\delta$  que queda tras pasar un primer cáncer podría ser una de las explicaciones de que encontremos una disminución significativa de  $LT\gamma\delta$  en los pacientes de CC respecto de los voluntarios sanos.

- O bien, podría deberse a una migración de los  $LT\gamma\delta$  circulantes en sangre periférica al microambiente tumoral.

En un estudio realizado en pacientes con CCR, plantean la hipótesis de que los  $LT\gamma\delta T17$ , que son claves en la inflamación y la inmunosupresión provocadas por el CCR, podrían migrar al tejido tumoral al producirse una polarización de las mismas iniciadas por la liberación de productos microbianos y consecuente acumulación y activación de las células dendríticas, debido a la ruptura de la barrera epitelial tumoral<sup>191</sup>.

Sin embargo, la pequeña proporción de  $LT\gamma\delta T17$  que hay presente en sangre periférica podrían hacer insignificante su importancia en los resultados de nuestro estudio.

En otro estudio realizado en muestras de tejidos de distintos tipos de cáncer, en los resultados encontrados en los pacientes con CCR observaron una densidad de  $LT\gamma\delta$  significativamente menor en tumor que en mucosa normal (proximal y distal)<sup>192</sup>.

Lo que indicaría que no ha habido migración de  $LT\gamma\delta$  al tejido tumoral.

- Otra posible explicación sería que los factores genéticos también podrían contribuir a la disminución de los porcentajes de los  $LT\gamma\delta$ . En pacientes con leucemia mieloide aguda, se observó una disminución significativa en sangre periférica, en la expresión génica de las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $z$  de los linfocitos T, lo que podría estar relacionado con la inmunodeficiencia de los LT. La leucemia mieloide aguda es la leucemia aguda más común que afecta a los adultos. Los niveles de expresión de los genes

CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  y CD3 $z$  se evaluó cuantitativamente mediante PCR en tiempo real en LT de muestras de población sana y de muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda<sup>193</sup>.

Si el patrón observado en la sangre periférica es un reflejo de lo que ocurre en las mucosas del colon, donde los LT $\gamma\delta$  son predominantes, la pérdida de LT $\gamma\delta$  estaría favoreciendo la carcinogénesis.

### **Aumento de apoptosis en LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en pacientes con CC**

En lo que respecta al aumento de la apoptosis que observamos en todas las subpoblaciones linfocitarias T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  en sangre periférica en pacientes de cáncer de colon puede ser consecuencia del escape tumoral.

Esto confirma como las células cancerosas o su entorno son particularmente eficaces en disminuir una parte muy importante de las células que ofrecen una respuesta inmune natural del organismo, aumentando la apoptosis de las células defensivas y con ello disminuyendo su frecuencia y pudiendo favorecer el desarrollo del cáncer.

Las células tumorales entran en la fase de escape después de haber fallado la mayoría de los mecanismos de supresión tumoral intrínsecos y extrínsecos. El escape de las células tumorales puede ocurrir a nivel de la misma célula y/o a nivel del microambiente tumoral. La reducción de la inmunogenicidad de dichas células, que puede ser causada por la pérdida de la proteína de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad, dificulta su reconocimiento por el sistema inmunológico<sup>194,195</sup>. Adicionalmente, las células tumorales pueden adquirir una resistencia contra funciones citotóxicas de células inmunes, a través de la expresión de moléculas antiapoptóticas. Lo que contribuye a la expansión de las células neoplásicas y a la carcinogénesis al crear un ambiente propicio para la inestabilidad genética y la acumulación de mutaciones que afecten a los puntos de control del ciclo celular que normalmente inducirían la apoptosis.<sup>194,196</sup> El escape puede darse también como consecuencia de una red compleja de

inmunodepresión dentro del microambiente tumoral. Existen diversos factores producidos por células tumorales o inmunes que contribuyen a la formación de un microambiente inmunodeprimido <sup>197</sup>, entre los que podríamos incluir el aumento de la apoptosis de los linfocitos.

En un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama los resultados obtenidos sugirieron que la respuesta inmune ineficaz y el escape del tumor de la vigilancia inmunológica es el resultado de la inducción de la apoptosis de linfocitos activados portadores del receptor Fas, por células de cáncer de mama portadoras de FasL. Así los tumores de mama pueden eludir la vigilancia inmunológica al inducir, a través del sistema Fas/FasL, la apoptosis de los linfocitos activados <sup>149</sup>. La sobreexpresión del ligando FAS se ha encontrado en otros estudios realizados en otro tipo de tumores. La regulación positiva de FasL puede correlacionarse con la progresión del carcinoma al inducir la apoptosis linfocitaria <sup>150151</sup>.

La comprensión de los mecanismos que median la apoptosis de los linfocitos y el papel que juega en los distintos tipos de cáncer es esencial para que, en un futuro cercano, la manipulación de la misma se convierta en una herramienta en las nuevas líneas de inmunoterapia.

#### **Diferencias en la frecuencia de LT $\gamma\delta$ en pacientes de CC con IMV respecto a pacientes sin infiltración vascular.**

Como hemos visto en la figura 5.8 al relacionar la frecuencia de las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con infiltración tumoral microvascular (IMV) observamos una disminución significativa en la frecuencia de los LT $\gamma\delta$  (LTCD8+  $\gamma\delta$  y LTCD56+  $\gamma\delta$ ) respecto a pacientes sin infiltración vascular.

Esta diferencia, no la observamos en la subpoblación de los LT $\alpha\beta$ , lo que sugiere la importancia de la función que cumplen los LT $\gamma\delta$  en la prevención de la IMV, evitando así la invasión del tumor a través de la sangre a otras zonas del cuerpo y con ello evitando la metástasis.

La IMV es una expresión del comportamiento biológico, agresivo del tumor que se considera un presagio de la diseminación hematológica de las células tumorales, lo que ha llamado cada vez más la atención, identificándose como un factor de riesgo independiente de mal pronóstico de supervivencia y de riesgo de recurrencia tumoral en muchos tumores sólidos<sup>198-203</sup>.

Es necesario seguir estudiando los LT $\gamma\delta$  como marcador predictivo de IMV y así disponer de esta información antes de definir el tratamiento.

En cuanto a la apoptosis, tan sólo se observa una disminución significativa en el subconjunto de células CD3+CD4+ $\alpha\beta$ .

### **Diferencias en la frecuencia y apoptosis de LT $\gamma\delta$ en pacientes con CC con AC respecto a pacientes sin AC.**

Encontramos una disminución significativa en la frecuencia y en la apoptosis de LT $\gamma\delta$  en pacientes con CC que tenían antecedentes de cáncer (AC), respecto a los que no tenían antecedentes.

En nuestro estudio contamos con 15 pacientes que han padecido un cáncer previo, lo que supone un 15,7% de la población de estudio. Entre 2009 y 2013, a casi el 20% de los pacientes con diagnóstico reciente de algún tipo de cáncer primario se les había diagnosticado uno o más cánceres en el pasado. Una cuarta parte de los adultos mayores de 65 años y más del 10 % de los adultos más jóvenes con diagnóstico reciente de cáncer tienen antecedentes de cáncer previo<sup>204</sup>.

Como hemos podido ver en la figura 5.9, estamos hablando de una diferencia del 50% menos de LT $\gamma\delta$  respecto de los pacientes sin AC, que a su vez ya presentaban una disminución del 50% respecto a los voluntarios sanos.

Esto implica que pacientes que han padecido un cáncer previo sufren una pérdida del 75% de los LT $\gamma\delta$  en comparación con los voluntarios sanos, lo que sugiere que vienen de una deficiencia previa y tienen una mayor predisposición al cáncer.

Razonablemente descartamos la posibilidad de que esta disminución de LT $\gamma\delta$  sea consecuencia del tratamiento antitumoral recibido previamente por los pacientes, por el

tiempo transcurrido hasta la actualidad y porque si esta fuera la causa, habría afectado a todas las subpoblaciones de linfocitos y nos solo a los  $LT\gamma\delta$ .

### **Diferencias en la frecuencia de $LT\gamma\delta$ en pacientes con CC con CS respecto a pacientes sin CS.**

También vemos una diferencia significativa en la frecuencia de los  $LT\gamma\delta$ , siendo menor en los pacientes con CC que presentan cáncer sincrónico (CS), respecto a los pacientes que no lo padecen.

El CS se define como dos o más neoplasias identificadas simultáneamente en el mismo paciente o un segundo tumor identificado hasta seis meses después del diagnóstico inicial. En nuestro estudio contamos con 7 pacientes con CS, 5 de los cuales son de colon.

Los cánceres de colon sincrónicos, definidos como dos o más cánceres de colon primarios detectados simultáneamente en el momento del diagnóstico inicial, representan hasta el 5 % de todos los diagnósticos de cáncer de colon<sup>205</sup>.

Se ha planteado que estos tumores multicéntricos puedan ser debida a la interacción de múltiples factores, entre los que cabría incluir determinada predisposición, tanto personal como familiar, mecanismos ambientales y/o relacionados con las características del tumor, aumentando así la probabilidad de desarrollar neoplasias en diferentes puntos del colon<sup>206</sup>.

Se sabe que los pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino, como la enfermedad de Crohn, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis y poliposis adenomatosa familiar tienen un mayor riesgo de cáncer colorrectal sincrónico<sup>207</sup>.

En un estudio previo se observó como pacientes con la enfermedad de Crohn presentaban también una frecuencia más baja de  $LT\gamma\delta$ <sup>208</sup> y como vemos en la figura 5.10 de nuestro estudio encontramos una disminución del 50% de  $LT\gamma\delta$  respecto de los pacientes que no presentan CS, lo que sugiere que esta inmunodeficiencia podría estar relacionada con ambas enfermedades acentuándose con la gravedad de las mismas.

Vemos un aumento de la apoptosis respecto de los voluntarios sanos, pero no encontramos diferencias significativas en la apoptosis entre los pacientes que presentan CS y los que no.

### **Relación entre la frecuencia y apoptosis de los LT y estadio tumoral.**

Cuando analizamos en los pacientes la frecuencia y apoptosis de los LT según el estadio tumoral, vemos una tendencia de aumento de la apoptosis en los pacientes cuando se encuentran en estadio II, tanto en las células  $\alpha\beta$  como en las  $\gamma\delta$ . Siendo esta tendencia más marcada en las células T CD3+CD56+  $\gamma\delta$ , en las cuales encontramos una diferencia significativa en la subpoblación CD3+CD56+ $\gamma\delta$ . Los pacientes que se encuentran en estadio II presentan unos valores de linfocitos CD3+CD56+ $\gamma\delta$  absolutos significativamente inferiores a los pacientes que se encuentran en estadio I.

Esto sugiere que en el estadio II hay mayor inducción de apoptosis provocada mediante moléculas activadoras, tales como receptores responsables de la citotoxicidad natural, tras su unión con ligandos expresados en células tumorales<sup>209</sup>.

En un estudio realizado en pacientes con cáncer de cuello uterino, se demostró como las células tumorales inducen la apoptosis de los LT citotóxicos expresando el ligando CD95<sup>210</sup>, o como la señalización CCL5/CCR5 que recluta Treg a los tumores y mejora su capacidad para matar las células T antitumorales CD8+, definiendo así un nuevo mecanismo de escape inmune en el cáncer colorrectal. Niveles más altos de expresión de CCL5 en células tumorales de colon humano se correlacionan con niveles más altos de apoptosis de células T CD8 +<sup>66</sup>.

En un estudio realizado en diferentes tipos de cáncer (mama, páncreas y colon) observaron que, según el tipo de cáncer, la densidad de células T  $\gamma\delta$  se correlacionó positiva o negativamente con la etapa TNM<sup>192</sup>.

La densidad de los LT $\gamma\delta$  tendía a ser menor en estadios avanzados, en el cáncer de mama, páncreas y colon, particularmente en el estadio IV (M1), siendo estadísticamente significativo para el cáncer de colon. En nuestros resultados, esta tendencia la observamos también en el estadio IV en los LT $\alpha\beta$ , sin embargo, en los LT $\gamma\delta$

el menor número de  $LT\gamma\delta$  lo encontramos en el estadio II, que es cuando encontramos el mayor porcentaje de células  $LT\gamma\delta$  en apoptosis. En todos los estadios vemos más apoptosis en las  $LT\gamma\delta$  que en los  $LT\alpha\beta$ , siendo la subpoblación más afectada la de  $LT CD3+ CD56+ \gamma\delta$ , que es la que encontramos en menor frecuencia y con mayor apoptosis en el estadio II. Es cierto que en nuestro estudio tan solo contamos con 4 pacientes que se encuentran en estadio IV.

Un estudio previo realizado en pacientes con carcinoma de células escamosas, demostró como los  $LT CD3+ CD56+ \gamma\delta$  son potentes efectores antitumorales. Vieron que además de mediar los efectos citotóxicos contra el tumor, eran importantes por su capacidad para resistir a la apoptosis inducida por las células tumorales<sup>211</sup>.

Esto no concuerda con los datos de nuestro estudio, donde vemos un aumento considerable de la apoptosis de los  $LT CD3+ CD56+ \gamma\delta$ , que puede ser debida al propio agotamiento de las mismas.

Nuestros resultados sugieren que la disminución de  $LT\gamma\delta$  en los pacientes de CCR podrían ser indicador de un mal pronóstico para el paciente y destaca la gran función antitumoral de los  $LT CD3+ CD56+ \gamma\delta$ , mediando los efectos citotóxicos antitumorales, siendo los más afectados y pudiendo ser insuficientes para controlar el crecimiento tumoral.

### **Relación entre la frecuencia y apoptosis de los LT según el grado de diferenciación, afectación ganglionar y localización anatómica del tumor**

Se ha demostrado que, en el CCR, características patológicas adicionales tienen importancia pronóstica independiente del estadio y son predictores importantes de recidiva local, así como de supervivencia de los pacientes. Entre tales características se incluye el grado de diferenciación del tumor<sup>212</sup>.

Aunque es controvertido, el grado tumoral generalmente se considera una variable pronóstica independiente del estadio, y la histología de alto grado o pobremente diferenciada se asocia con un mal pronóstico de supervivencia del paciente<sup>213,214</sup>.

En nuestros resultados obtenidos las diferencias entre subpoblaciones de LT según el grado de diferenciación del tumor, van en sentido contrario, mientras que encontramos una disminución no significativa de la frecuencia de los LT  $\gamma\delta$  en los pacientes con adenomas moderada y pobremente diferenciados, ocurre lo contrario en los LT  $\alpha\beta$ , donde vemos un aumento no significativo.

Esta disminución de LT  $\gamma\delta$  puede sugerir de nuevo la importante función antitumoral de los LT  $\gamma\delta$ , en sangre periférica, al encontrarlos más disminuidos en pacientes con peor pronóstico.

Respecto a la frecuencia de la apoptosis no encontramos diferencias entre unos pacientes y otros.

Otra característica anatomopatológica de la que depende la patogenia del CCR, es la localización anatómica del tumor y difiere entre el lado derecho y el lado izquierdo del colon. Los tumores en el colon proximal (lado derecho) y el colon distal (lado izquierdo) exhiben características moleculares e histología diferentes. El comportamiento del CCR está muy afectado por la localización anatómica del tumor, que a su vez afecta a sus características moleculares e inmunológicas. Comprender las características de estas dos entidades diferentes es muy importante para desarrollar terapias efectivas<sup>41,215</sup>

Se comportan de manera diferente en términos de progresión de la enfermedad y supervivencia general. La diferencia entre estos tumores se puede atribuir al origen anatómico y del desarrollo, o a distintos factores cancerígenos (como la diferencia en la población bacteriana en los dos lados del colon, o la exposición a distintos nutrientes y ácidos biliares), o una combinación de ambos<sup>216</sup>.

En nuestro estudio, al agrupar a los pacientes según la localización anatómica del tumor, no encontramos diferencias significativas ni en apoptosis, ni en los valores absolutos de las diferentes subpoblaciones de LT circulantes.

Entre los factores pronósticos estudiados en pacientes operados de adenocarcinoma colorrectal estadios II y III destaca la afectación ganglionar, la

supervivencia empeora claramente según aumenta el número de ganglios afectados por el tumor<sup>217</sup>.

En estudios previos al analizar los valores de LT circulantes en función del estadio tumoral, observaron como en pacientes con cáncer de mama los recuentos de LT en pacientes en estadio III fueron menores en comparación con los de pacientes en estadio I<sup>218</sup>. En pacientes con melanoma clasificados según el estadio de la enfermedad, observaron que la tasa de los LT  $\gamma\delta$  disminuyó en el melanoma en estadio avanzado. Los pacientes en estadio III–IV mostraron una frecuencia más baja de LT  $\gamma\delta$  circulantes que los pacientes en estadio temprano I–II, lo que sugiere un reclutamiento preferencial de células T  $\gamma\delta$  al sitio del tumor<sup>219</sup>.

En nuestro estudio al agrupar a los pacientes entre pacientes con afectación ganglionar (N+) y pacientes sin afectación ganglionar (N0), no hallamos diferencias significativas en las frecuencias de LT ni en la apoptosis de las mismas. Observamos un menor número de LT  $\gamma\delta$  en pacientes con afectación ganglionar, en comparación con quienes no tenían ganglios afectados, lo que podría apoyar un posible reclutamiento de LT  $\gamma\delta$  al sitio del tumor.

## 7. CONCLUSIONES



## 7 CONCLUSIONES

1. Las personas con CC presentan una disminución significativa en el número total de los  $LT\gamma\delta$ , en sangre periférica, respecto a sujetos sanos. La apoptosis de todas las subpoblaciones linfocitarias T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  está significativamente aumentada en los pacientes con cáncer de colon.

2. Esta disminución de  $LT\gamma\delta$  se relaciona con criterios de riesgo asociados al CC, como son pacientes con antecedentes de cáncer y pacientes con cáncer sincrónico.

3. Así mismo hemos encontrado que la disminución de  $LT\gamma\delta$  se relaciona con la infiltración microvascular. No se hallaron diferencias significativas en la frecuencia y apoptosis de las subpoblaciones de los LT, según el grado de diferenciación del tumor, afectación ganglionar y localización anatómica del tumor. Observamos un aumento no significativo, de la apoptosis en los pacientes con estadios II, tanto en las poblaciones  $\alpha\beta$  como en las  $\gamma\delta$ .



## 8. BIBLIOGRAFÍA



## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
4. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;62:1180-1190.
5. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer Part A*. 1997;33:787-791.
6. Folkman J. Fundamental Concepts of the Angiogenic Process. *Curr Mol Med*. 2003;3:643-651.
7. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science (1979)*. 1956;124:269-270.
8. McDermott FT, Hughes ESR, Pihl E, Milne BJ, Price AB. Prognosis in relation to symptom duration in colon cancer. *British Journal of Surgery*. 1981;68(12):846-849. doi:10.1002/bjs.1800681206
9. Galceran J, Amejide A, Carulla M, et al. *Estimaciones de La Incidencia y La Supervivencia Del Cáncer En España y Su Situación En Europa.*; 2014. doi:10.1002/ajmg.a.37352
10. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262 [doi]
11. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90. doi:10.3322/caac.20107

12. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, et al. Situación del cáncer en España: incidencia. *An Sist Sanit Navar*. 2008;27(2):165-173. doi:10.4321/S1137-66272004000300001
13. ESTIMACIONES DE LA INCIDENCIA DEL CÁNCER EN ESPAÑA.
14. Wender R, Brooks D SR. Colon Cancer Rising Among Young Adults. American Cancer Society. [www.cancer.org/cancer/news/news/colon-cancer-cases-rising-among-young-adults](http://www.cancer.org/cancer/news/news/colon-cancer-cases-rising-among-young-adults).
15. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(7):1099. doi:10.1007/DCR.0b013e3181d60a51
16. Chan A, Giovannucci E. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2029-2043. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.057.Primary
17. Lindberg LJ, Ladelund S, Frederiksen BL, Smith-Hansen L, Bernstein I. Outcome of 24 years national surveillance in different hereditary colorectal cancer subgroups leading to more individualised surveillance. *J Med Genet*. Published online 2016;jmedgenet-2016-104284. doi:10.1136/jmedgenet-2016-104284
18. Vial MT, Ibarra Á. ANATOMÍA PATOLÓGICA Y TUMORES HEREDITARIOS. *Revista Médica Clínica Las Condes*. Published online 2017. doi:10.1016/j.rmclc.2017.07.002
19. Setaffy L, Langner C. Microsatellite instability in colorectal cancer: Clinicopathological significance. *Polish Journal of Pathology*. Published online 2015. doi:10.5114/pjp.2015.54953
20. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. SPECIAL REPORTS AND REVIEWS Genetics, Natural History, Tumor Spectrum, and Pathology of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: An Updated Review. *Gastroenterology*. Published online 1993.
21. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4(1):22. doi:10.1186/1750-1172-4-22

22. Eddy DM. Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 1990;113(5):373-384. [papers://5aefccea-9729-4def-92fe-c46e5cd7cc81/Paper/p54452](https://papers://5aefccea-9729-4def-92fe-c46e5cd7cc81/Paper/p54452)
23. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. Accessed October 3, 2022. <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
24. Scosyrev E, Messing J, Noyes K, Veazie P, Messing E. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) program and population-based research in urologic oncology: An overview. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2012;30(2):126-132. doi:10.1016/j.urolonc.2009.11.005
25. Singh KE, Taylor TH, Pan CG, Stamos MJ, Zell JA. Colorectal Cancer Incidence Among Young Adults in California. *J Adolesc Young Adult Oncol.* 2014;3(4):176-184. doi:10.1089/jayao.2014.0006
26. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30. doi:10.3322/caac.21332
27. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer.* 2012;118(14):3636-3644. doi:10.1002/cncr.26677
28. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and Colorectal Cancer. *JAMA.* 2008;300(23):2765. doi:10.1001/jama.2008.839
29. Norat T, Bingham S, Ferrari P, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European prospective investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(12):906-916. doi:10.1093/jnci/dji164
30. Mizoue T, Inoue M, Wakai K, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer in Japanese: a pooled analysis of results from five cohort studies. *Am J Epidemiol.* 2008;167(12):1397-1406. doi:10.1093/aje/kwn073

31. ¿Qué es el cáncer colorrectal? Accessed October 3, 2022.  
<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/acerca/que-es-cancer-de-colon-o-recto.html>
32. progression-of-colorectal-cancer.jpg (729×436). Accessed October 3, 2022.  
<https://abnormalfacies.files.wordpress.com/2011/04/progression-of-colorectal-cancer.jpg>
33. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153.  
doi:10.3978/J.ISSN.2078-6891.2012.030
34. Tapia OE, Carlos Roa JS, Manterola CD, Bellolio TAPIA EJ, Cáncer JE. Cáncer de Colon y Recto: Descripción Morfológica y Clínica de 322 Casos. *International Journal of Morphology*. 2010;28(2):393-398. doi:10.4067/S0717-95022010000200010
35. CC C, LP F, LJ B, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):43-53. doi:10.5858/2000-124-0979-PFICC
36. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):1016-1025. doi:10.5858/2000-124-1016-UPFTEO
37. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer*. 2002;101(5):403-408. doi:10.1002/IJC.10635
38. 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;13(1):157-162. doi:10.5114/AOMS.2016.58596
39. Marzouk O, Schofield J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2):2767-2810. doi:10.3390/CANCERS3022767

40. Gualco G, Reissenweber N, Cliché I, Bacchi CE. Flat elevated lesions of the colon and rectum: a spectrum of neoplastic and nonneoplastic entities. *Ann Diagn Pathol.* 2006;10(6):333-338. doi:10.1016/J.ANNDIAGPATH.2006.03.003
41. Nawa T, Kato J, Kawamoto H, et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(3):418-423. doi:10.1111/J.1440-1746.2007.04923.X
42. Thörn M, Bergström R, Kressner U, Sparén P, Zack M, Ekblom A. Trends in colorectal cancer incidence in Sweden 1959-93 by gender, localization, time period, and birth cohort. *Cancer Causes and Control.* 1998;9(2):145-152. doi:10.1023/A:1008826109697
43. Stewart RJ, Stewart AW, Turnbull PR, Isbister WH. Sex differences in subsite incidence of large-bowel cancer. *Dis Colon Rectum.* 1983;26(10):658-660. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6884156>
44. Schub R, Steinheber FU. Rightward shift of colon cancer. A feature of the aging gut. *J Clin Gastroenterol.* 1986;8(6):630-634. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3805659>
45. Glebov O, Rodriguez L, Nakahara K, Jenkins J. Distinguir el colon derecho del izquierdo por el patrón de expresión génica. *Biomarcadores y prevención.* Published online 2003. Accessed December 4, 2022. <https://aacrjournals.org/cebp/article-abstract/12/8/755/65543>
46. Ogata D, Namikawa K, Takahashi A, Yamazaki N. A review of the AJCC melanoma staging system in the TNM classification (eighth edition). *Jpn J Clin Oncol.* 2021;51(5):671-674. doi:10.1093/JJCO/HYAB022
47. Edge SSB, Compton CC, Byrd D, et al. *AJCC Cancer Staging Manual.* Vol 17.; 2010. doi:10.1245/s10434-010-0985-4
48. Motta Ramírez GA, Alonso Blancas E, Lozano Dubernard G, Urbina de la Vega JF, Valenzuela Tamariz J. La evaluación del cáncer colorrectal por tomografía computarizada multidetector. *Gaceta Mexicana de Oncología.* 2011;10(5):252-264. Accessed September 28, 2022. <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta->

- mexicana-oncologia-305-articulo-la-evaluacion-del-cancer-colorrectal-X1665920111894251
49. Cáncer colorrectal: Estadios | Cancer.Net. Accessed September 28, 2022. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-colorrectal/estadios>
  50. Johnsen AK, Templeton DJ, Sy M, Harding C v. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *Journal of Immunology*. 1999;163(8):4224-4231.
  51. Donia M, Andersen R, Kjeldsen JW, et al. Aberrant expression of MHC Class II in melanoma attracts inflammatory tumor specific CD4+ T cells which dampen CD8+ T cell antitumor reactivity. *Cancer Res*. 2015;(15):3747-3760. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2956
  52. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015;160(1-2):48-61. doi:10.1016/j.cell.2014.12.033
  53. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(9):819-829. doi:10.1056/NEJMoa1604958
  54. Reeves E, James E. Antigen processing and immune regulation in the response to tumours. *Immunology*. 2017;150(1):16. doi:10.1111/IMM.12675
  55. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2015;125(7):1061-1072. doi:10.1182/blood-2014-11-610436
  56. Amend SR, Pienta KJ. Ecology meets cancer biology: the cancer swamp promotes the lethal cancer phenotype. *Oncotarget*. 2015;6(12):9669-9678. doi:10.18632/oncotarget.3430
  57. Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat Med*. 2011;17(9):1094-1100. doi:10.1038/nm.2438

58. Finn OJ. Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. In: *Annals of Oncology*. ; 2012.  
doi:10.1093/annonc/mds256
59. Langevin S, Kuhnell D, Parry T, Biesiada J, Huang S, Wise-Draper T, Casper K, Zhang X, Medvedovic M KS. Comprehensive microRNA-sequencing of exosomes derived from head and neck carcinoma cells in vitro reveals common secretion profiles and potential utility as salivary biomarkers. *Oncotarget*. 2017;8(47):82459-82474.
60. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-571.  
doi:10.1038/nature13954
61. Cifaldi L, Locatelli F, Marasco E, Moretta L P v. Boosting Natural Killer Cell-Based Immunotherapy with Anticancer Drugs: a Perspective. *Trends Mol Med*. Published online 2017;pii: S1471-4914(17)30182-X.
62. Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, Paschen A, Garrido F. Implication of the  $\beta 2$ -microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012;61(9):1359-1371.  
doi:10.1007/s00262-012-1321-6
63. Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M. Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *Int J Cancer*. 2010;127(5):1001-1010.  
doi:10.1002/ijc.25283
64. Liu K. Role of apoptosis resistance in immune evasion and metastasis of colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2010;2(11):399-406.  
doi:10.4251/wjgo.v2.i11.399
65. Sträter J, Hinz U, Hasel C, et al. Impaired CD95 expression predisposes for recurrence in curatively resected colon carcinoma: clinical evidence for immunoselection and CD95L mediated control of minimal residual disease. *Gut*. 2005;54(5):661-665. doi:10.1136/gut.2004.052696
66. Chang LY, Lin YC, Mahalingam J, et al. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- $\beta$ -mediated killing of CD8 + T cells in colon cancer by T-

- regulatory cells. *Cancer Res.* 2012;72(5):1092-1102. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2493
67. Houston AM, Michael-Robinson JM, Walsh MD, et al. The “Fas counterattack” is not an active mode of tumor immune evasion in colorectal cancer with high-level microsatellite instability. *Hum Pathol.* 2008;39(2):243-250. doi:10.1016/j.humpath.2007.06.010
68. Sträter J, Hinz U, Hasel C, et al. Impaired CD95 expression predisposes for recurrence in curatively resected colon carcinoma: clinical evidence for immunoselection and CD95L mediated control of minimal residual disease. *Gut.* 2005;54(5):661. doi:10.1136/GUT.2004.052696
69. Prczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K KA. Fas/FasL expression in colorectal cancer. An immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010;48:425–429 doi: 10.2478/v10042-010-0058-3.
70. Bossard C, Bézieau S, Matysiak-Budnik T, et al. HLA-E/ $\beta$ 2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *Int J Cancer.* 2012;131(4):855-863. doi:10.1002/ijc.26453
71. Levy EM, Sycz G, Arriaga JM, et al. Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. *Innate Immun.* 2009;15(2):91-100. doi:10.1177/1753425908101404
72. Sharma P, Wagner K, Wolchok JD, Allison JP. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(11):805-812. doi:10.1038/nrc3153
73. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011;480(7378):480-489. doi:10.1038/nature10673
74. Kakimi K, Kondo A, Matsushita H. [Dendritic cells for cancer immunotherapy]. *Nihon Rinsho.* 2012;70(12):2130-2135. doi:10.23938/ASSN.0077
75. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(11):850-861. doi:10.1038/NRC928

76. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. 1997;18(2):89-95. doi:10.1016/S0167-5699(96)10075-X
77. Eissmann P. BLOQUE: CÉLULAS Células Natural Killer.
78. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225-274. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.23.021704.115526
79. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology*. 2009;126(4):449-457. doi:10.1111/J.1365-2567.2009.03045.X
80. CÉLULAS NK Y RECEPTORES KIR (Parte I). Accessed November 3, 2022. <https://www.rafer.es/innovacion-laboratorio-clinico/celulas-nk-y-receptores-kir-parte-i/>
81. Ebert EC, Brolin RE, Roberts AI. Characterization of activated lymphocytes in colon cancer. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;50(1 Pt 1):72-81. doi:10.1016/0090-1229(89)90223-7
82. Paijens ST, Vledder A, de Bruyn M, Nijman HW. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(4):842. doi:10.1038/S41423-020-00565-9
83. Franken L, Schiwon M, Kurts C. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cell Microbiol*. 2016;18(4):475-487. doi:10.1111/CMI.12580
84. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014;5(OCT). doi:10.3389/FIMMU.2014.00514
85. Zhong X, Chen B, Yang Z. The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(1):356-365. doi:10.1159/000486816
86. Hortelano S. Inflamación y macrófagos: amigos o enemigos. Published online January 1, 2014. doi:10.18567/SEBBMDIV\_ANC.2014.01.1

87. Chien YH, Meyer C, Bonneville M.  $\gamma\delta$  T Cells: First Line of Defense and Beyond. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120216>. 2014;32:121-155. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032713-120216
88. Bonneville M, Janeway CA, Ito K, et al. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of  $\gamma\delta$  T cells. *Nature* 1988 336:6198. 1988;336(6198):479-481. doi:10.1038/336479a0
89. Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:511-532. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.14.1.511
90. Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SHE, Wagner H. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of gamma/delta T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur J Immunol*. 1990;20(5):1175-1179. doi:10.1002/EJI.1830200534
91. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(17):8175-8179. doi:10.1073/PNAS.91.17.8175
92. Morita CT, Li H, Lamphear JG, et al. Superantigen recognition by gammadelta T cells: SEA recognition site for human Vgamma2 T cell receptors. *Immunity*. 2001;14(3):331-344. doi:10.1016/S1074-7613(01)00113-3
93. Dr. Marcelo R. Regueiro Inmunología ppt descargar. Accessed July 7, 2022. <https://slideplayer.es/slide/16808936/>
94. Danska JS, Livingstone AM, Paragas V, Ishihara T, Garrison Fathman C. The presumptive CDR3 regions of both T cell receptor alpha and beta chains determine T cell specificity for myoglobin peptides. *J Exp Med*. 1990;172(1):27-33. doi:10.1084/JEM.172.1.27
95. Chothia C, Boswell DR, Lesk AM. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J*. 1988;7(12):3745. doi:10.1002/J.1460-2075.1988.TB03258.X
96. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 1994;76(2):263-274. doi:10.1016/0092-8674(94)90334-4

97. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity*. 2006;24(2):133-139.  
doi:10.1016/J.IMMUNI.2006.01.006
98. Garcia-Mariscal A, del Blanco B, Hernandez-Munain C. Generación de diversidad de los receptores de antígeno en linfocitos: validación del «modelo de accesibilidad» en el control de la recombinación V(D)J. *Inmunología*. 2013;32(2):57-69. doi:10.1016/J.INMUNO.2012.07.003
99. Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*. 2004;20(6):735-745.  
doi:10.1016/J.IMMUNI.2004.05.004/ATTACHMENT/E8C5295D-B175-4EAC-9837-4212D1D9A1C0/MMC1.JPG
100. Allman D, Sambandam A, Kim S, et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol*. 2003;4(2):168-174. doi:10.1038/NI878
101. Desarrollo de la célula T en el timo | British Society for Immunology. Accessed July 5, 2022. <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/immune-development/desarrollo-de-la-c%C3%A9lula-t-en-el-timo>
102. Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA, Rothenberg E v. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity*. 2006;24(1):53-64.  
doi:10.1016/J.IMMUNI.2005.11.012
103. von Boehmer H. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(7):571-577. doi:10.1038/NRI1636
104. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and Negative Selection of T Cells. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107>. 2003;21:139-176.  
doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.21.120601.141107
105. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry Part A*. 2019;95(6):647-654. doi:10.1002/CYTO.A.23724

106. Nomura A, Taniuchi I. The Role of CD8 Downregulation during Thymocyte Differentiation. *Trends Immunol.* 2020;41(11):972-981.  
doi:10.1016/J.IT.2020.09.006
107. Majumdar S, Pathak S, Nandi D. Thymus: The Site for Development of Cellular Immunity. *Resonance.* 2018;23(2):197-217. doi:10.1007/S12045-018-0605-3
108. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol.* 2013;25(4):305.  
doi:10.1016/J.SMIM.2013.10.009
109. Chen J, Li J, Gao H, et al. Comprehensive Evaluation of Different T-Helper Cell Subsets Differentiation and Function in Rheumatoid Arthritis. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012. doi:10.1155/2012/535361
110. (PDF) EVASIÓN INMUNOLÓGICA POR BORRELIA BURGDORFERI – CON ESPECIAL REFERENCIA A LA QUIMOTAXIA DE NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS MEDIADA POR CD38. Accessed July 6, 2022.  
[https://www.researchgate.net/publication/268341022\\_IMMUNE\\_EVASION\\_BY\\_BORRELIA\\_BURGDORFERI\\_WITH\\_SPECIAL\\_REFERENCE\\_TO\\_CD38-MEDIATED\\_CHEMOTAXIS\\_OF\\_NEUTROPHILS\\_AND\\_DENDRITIC\\_CELLS](https://www.researchgate.net/publication/268341022_IMMUNE_EVASION_BY_BORRELIA_BURGDORFERI_WITH_SPECIAL_REFERENCE_TO_CD38-MEDIATED_CHEMOTAXIS_OF_NEUTROPHILS_AND_DENDRITIC_CELLS)
111. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996;383(6603):787-793. doi:10.1038/383787A0
112. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-173. doi:10.1146/ANNUREV.IY.07.040189.001045
113. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: The third member of the effector T cell Trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(6):652. doi:10.1016/J.COI.2007.07.020
114. Dang E v., Barbi J, Yang HY, et al. Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-inducible Factor 1. *Cell.* 2011;146(5):772. doi:10.1016/J.CELL.2011.07.033

115. CD8+ T Cells | British Society for Immunology. Accessed July 6, 2022. <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/cells/c%3%A9lulas-t-cd8>
116. Los linfocitos T  $\gamma\delta$  y su papel en procesos de hipersensibilidad en la mucosa digestiva y respiratoria. Accessed July 7, 2022. <https://www.elsevier.es/en-revista-allergologia-et-immunopathologia-105-pdf-13038906>
117. Hayday AC.  $\gamma\delta$  T Cell Update: Adaptate Orchestrators of Immune Surveillance. *The Journal of Immunology*. 2019;203(2):311-320. doi:10.4049/JIMMUNOL.1800934
118. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(17):8175-8179. doi:10.1073/PNAS.91.17.8175
119. Células T Gamma Delta ( $\gamma\delta$ ) | British Society for Immunology. Accessed July 7, 2022. <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/cells/c%3%A9lulas-t-gamma-delta-%CE%B3%CE%B4>
120. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*. 1998;279(4):300-307. doi:10.1001/JAMA.279.4.300
121. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-592. doi:10.1002/CBIN.11137
122. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:367-401. doi:10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.41.1.367
123. Tres formas básicas de muerte celular: Apoptosis (condensación cromosómica, fragmentación nuclear), autofagia (formación de autofagosomas), necrosis Imagen Vector de stock - Alamy. Accessed July 7, 2022. <https://www.alamy.es/tres-formas-basicas-de-muerte-celular-apoptosis-condensacion-cromosomica-fragmentacion-nuclear-autofagia-formacion-de-autofagosomas-necrosis-image470350652.html?imageid=6C933DD1-599F-480A-A96B->

- B189B616DEEF&p=1874388&pn=1&searchId=7b1cfa97ac3a3078ce81839f493bd2b3&searchtype=0
124. Apoptosis: muerte celular programada | Offarm. Accessed July 7, 2022.  
<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-apoptosis-muerte-celular-programada-13049112>
  125. Schulze-Bergkamen H, Krammer PH. Apoptosis in Cancer - Implications for Therapy. *Semin Oncol*. 2004;31(1):90-119.  
doi:10.1053/j.seminoncol.2003.11.006
  126. López-Trinidad BP, Konigsberg M, -Rodríguez A, et al. Apoptosis en espermatozoides Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. *Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa*. 1:5. Accessed July 8, 2022. [www.reibci.org](http://www.reibci.org)
  127. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002;9(3):459-470. doi:10.1016/S1097-2765(02)00482-3
  128. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116(2):205-219. doi:10.1016/S0092-8674(04)00046-7
  129. Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science (1979)*. 1998;281(5381):1305-1308. doi:10.1126/SCIENCE.281.5381.1305
  130. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008 27:48. 2008;27(48):6194-6206. doi:10.1038/onc.2008.297
  131. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-776. doi:10.1038/35037710
  132. Apoptosis Y Ciclo Celular. Accessed July 8, 2022.  
<https://es.slideshare.net/guest18ad09/apoptosis-y-ciclo-celular>
  133. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000;10(9):369-377. doi:10.1016/S0962-8924(00)01803-1
  134. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495. doi:10.1080/01926230701320337

135. Schultz DR, Harrington WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*. 2003;32(6):345-369.  
doi:10.1053/SARH.2003.50005
136. - AllScience. Accessed July 12, 2022. <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/12684405-que-es-la-apoptosis>
137. Bases moleculares de la apoptosis.
138. Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol*. 2000;129(2-3):346-358. doi:10.1006/JSBI.2000.4254
139. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 20):4077-4085. doi:10.1242/JCS.00739
140. Shi Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol Cell*. 2002;9(3):459-470. doi:10.1016/S1097-2765(02)00482-3
141. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(6):118688.  
doi:10.1016/J.BBAMCR.2020.118688
142. Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday a C, Eisen HN, Tonegawa S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature*. 1984;309(5971):757-762. doi:10.1038/309757a0
143. Hou L, Wang T, Sun J.  $\gamma\delta$  T cells in infection and autoimmunity. *Int Immunopharmacol*. 2015;28(2):887-891. doi:10.1016/J.INTIMP.2015.03.038
144. Silva-Santos B, Serre K, Norell H.  $\gamma\delta$  T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(11):683-691. doi:10.1038/NRI3904
145. Fisher JP, Heuijers J, Yan M, Gustafsson K, Anderson J.  $\gamma\delta$  T cells for cancer immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology*. 2014;3(1):e27572. doi:10.4161/onci.27572
146. Ramutton T, Buccheri S, Dieli F, Todaro M, Stassi G, Meraviglia S.  $\gamma\delta$  T cells as a potential tool in colon cancer immunotherapy.  
<http://dx.doi.org/102217/imt1459>. 2014;6(9):989-999. doi:10.2217/IMT.14.59

147. Catalan-Serra I, Sandvik AK, Bruland T, Andreu-Ballester JC. Gammadelta T Cells in Crohn's Disease: A New Player in the Disease Pathogenesis? *J Crohns Colitis*. 2017;11(9):1135-1145. doi:10.1093/ECCO-JCC/JJX039
148. Andreu-Ballester JC, Catalán-Serra I, Gil-Borrás R, et al. Gammadelta T cells as a predictor of surgical relapse of Crohn's disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2020;44(4):586-597. doi:10.1016/J.CLINRE.2019.11.003
149. Gutierrez LS, Eliza M, Niven-Fairchild T, Naftolin F, Mor G. The Fas/Fas-ligand system: a mechanism for immune evasion in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;54(3):245-253. doi:10.1023/A:1006102601215
150. Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, et al. Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut*. 1999;44(2):156-162. doi:10.1136/GUT.44.2.156
151. Osaki M, Kase S, Kodani I, Watanabe M, Adachi H, Ito H. Expression of Fas and Fas ligand in human gastric adenomas and intestinal-type carcinomas: correlation with proliferation and apoptosis. *Gastric Cancer*. 2001;4(4):198-205. doi:10.1007/S10120-001-8010-Z
152. Zhang M, Lu X, Wei C, Li X. Association between  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cell subsets and clinicopathological characteristics in patients with breast cancer. *Oncol Lett*. 2020;20(6). doi:10.3892/OL.2020.12188
153. CASE REPORT. doi:10.12669/pjms.291.2277
154. Navarro Rodríguez JM, Gallego Plazas J, Borrás Rocher F, Calpena Rico R, Ruiz Macia JA, Morcillo Ródenas MÁ. ¿Es posible predecir la presencia de cáncer colorrectal en el análisis sanguíneo?: método de aproximación probabilística. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2017;109(10):694-703. doi:10.17235/REED.2017.4645/2016
155. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res*. 2006;4(4):221-233. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0261
156. Roxburgh CSD, McMillan DC. Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1409-1412. doi:10.1038/BJC.2014.90

157. Laird BJ, Kaasa S, McMillan DC, et al. Prognostic factors in patients with advanced cancer: a comparison of clinicopathological factors and the development of an inflammation-based prognostic system. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):5456-5464. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1066
158. Maeda K, Shibutani M, Otani H, et al. Inflammation-based factors and prognosis in patients with colorectal cancer. Published online 2015. doi:10.4251/wjgo.v7.i8.111
159. Pei XH, Nakanishi Y, Takayama K, Bai F, Hara N. Granulocyte, granulocyte-macrophage, and macrophage colony-stimulating factors can stimulate the invasive capacity of human lung cancer cells. *Br J Cancer.* 1999;79(1):40-46. doi:10.1038/sj.bjc.6690009
160. Pedrazzani C, Mantovani G, Fernandes E, et al. Assessment of neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio and platelet count as predictors of long-term outcome after R0 resection for colorectal cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1). doi:10.1038/S41598-017-01652-0
161. Gregory AD, Houghton AMG. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 2011;71(7):2411-2416. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2583
162. Dimitriou N, Felekouras E, Karavokyros I, Alexandrou A, Pikoulis E, Gkiniatsos J. Neutrophils to lymphocytes ratio as a useful prognosticator for stage II colorectal cancer patients. *BMC Cancer.* 2018;18(1). doi:10.1186/S12885-018-5042-X
163. Joseph N, Dovedi SJ, Thompson C, et al. Pre-treatment lymphocytopenia is an adverse prognostic biomarker in muscle-invasive and advanced bladder cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(2):294-299. doi:10.1093/ANNONC/MDV546
164. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(6). doi:10.1093/JNCI/DJU124
165. Buergy D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer.* 2012;130(12):2747-2760. doi:10.1002/IJC.27441

166. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
167. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):e218-e228. doi:10.1016/S1470-2045(12)70582-X
168. Imai T, Koike K, Kubo T, et al. Interleukin-6 Supports Human Megakaryocytic Proliferation and Differentiation In Vitro. Accessed November 29, 2022. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/78/8/1969/619276/1969.pdf>
169. Kwon HC, Kim SH, Oh SY, et al. Clinical significance of preoperative neutrophil-lymphocyte versus platelet-lymphocyte ratio in patients with operable colorectal cancer. *Biomarkers*. 2012;17(3):216-222. doi:10.3109/1354750X.2012.656705
170. Andreu-Ballester JC, Amigó-García V, Catalán-Serra I, et al. Deficit of Gammadelta T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Crohn's Disease. *Digestive Diseases and Sciences* 2011 56:9. 2011;56(9):2613-2622. doi:10.1007/S10620-011-1636-8
171. meyer lital, Simian daniela, KronberG udo, et al. Desarrollo de neoplasia en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal Development of malignant tumors in patients with inflammatory bowel disease. *Rev Med Chile*. 2015;143:834-840.
172. Cheddani H, Dauchet L, Fumery M, et al. Cancer in Elderly Onset Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study. *American Journal of Gastroenterology*. 2016;111(10):1428-1436. doi:10.1038/ajg.2016.304
173. Zhang M, Lu X, Wei C, Li X. Association between  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cell subsets and clinicopathological characteristics in patients with breast cancer. *Oncol Lett*. 2020;20(6). doi:10.3892/OL.2020.12188
174. Andreu-Ballester JC, Tormo-Calandín C, Garcia-Ballesteros C, et al. Association of  $\gamma\delta$  T Cells with Disease Severity and Mortality in Septic Patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(5):738. doi:10.1128/CVI.00752-12

175. Chabab G, Barjon C, Abdellaoui N, et al. Identification of a regulatory V $\delta$ 1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer. *J Leukoc Biol.* 2020;107(6):1057-1067. doi:10.1002/JLB.3MA0420-278RR
176. Barjon C, Michaud HA, Fages A, et al. IL-21 promotes the development of a CD73-positive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell regulatory population. *Oncoimmunology.* 2017;7(1). doi:10.1080/2162402X.2017.1379642
177. Ma S, Cheng Q, Cai Y, et al. IL-17A produced by  $\gamma\delta$  T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2014;74(7):1969-1982. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2534
178. Coffelt SB, Kersten K, Dornebal CW, et al. IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2015;522(7556):345-348. doi:10.1038/NATURE14282
179. Rei M, Gonçalves-Sousa N, Lança T, et al. Murine CD27(-) V $\gamma$ 6(+)  $\gamma\delta$  T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(34). doi:10.1073/PNAS.1403424111/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201403424SI.PDF
180. Wu P, Wu D, Ni C, et al.  $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity.* 2014;40(5):785-800. doi:10.1016/J.IMMUNI.2014.03.013
181. Ma Y, Aymeric L, Locher C, et al. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med.* 2011;208(3):491-503. doi:10.1084/JEM.20100269
182. Gamma Delta ( $\gamma\delta$ ) T Cells | British Society for Immunology. Accessed September 22, 2022. <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/cells/c%3%A9lulas-t-gamma-delta-%CE%B3%CE%B4>
183. Ueta C, Tsuyuguchi I, Kawasumi H, Takashima T, Toba H, Kishimoto S. Increase of gamma/delta T cells in hospital workers who are in close contact with

- tuberculosis patients. *Infect Immun.* 1994;62(12):5434-5441.  
doi:10.1128/IAI.62.12.5434-5441.1994
184. Kagnoff MF. Current concepts in mucosal immunity. III. Ontogeny and function of gamma delta T cells in the intestine. *Am J Physiol.* 1998;274(3).  
doi:10.1152/AJPGI.1998.274.3.G455
185. Zheng BJ, Ng SP, Chua DTT, et al. Peripheral  $\gamma\delta$  T-cell deficit in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 2002;99(2):213-217. doi:10.1002/IJC.10326
186. Cuéllar C, Rodero M, Pérez-Griera J, et al. Association between anti-Anisakis simplex antibodies and interleukin-7 levels. *Int Immunopharmacol.* 2022;111.  
doi:10.1016/J.INTIMP.2022.109134
187. Hu Y, Chen D, Hong M, et al. Apoptosis, Pyroptosis, and Ferroptosis Conspiringly Induce Immunosuppressive Hepatocellular Carcinoma Microenvironment and  $\gamma\delta$  T-Cell Imbalance. *Front Immunol.* 2022;13.  
doi:10.3389/FIMMU.2022.845974/FULL
188. Choudhary A, Davodeau F, Moreau A, Peyrat MA, Bonneville M, Jotereau F. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *The Journal of Immunology.* 1995;154(8).
189. Bank I, Marcu-Malina V. Quantitative peripheral blood perturbations of  $\gamma\delta$  T cells in human disease and their clinical implications. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014;47(3):311-333. doi:10.1007/S12016-013-8391-X
190. He W, Hu Y, Chen D, et al. Hepatocellular carcinoma-infiltrating  $\gamma\delta$  T cells are functionally defected and allogenic V $\delta$ 2 +  $\gamma\delta$  T cell can be a promising complement. *Clin Transl Med.* 2022;12(4). doi:10.1002/CTM2.800
191. Wu P, Wu D, Ni C, et al.  $\gamma\delta$ T17 Cells Promote the Accumulation and Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Human Colorectal Cancer. *Immunity.* 2014;40(5):785. doi:10.1016/J.IMMUNI.2014.03.013
192. Chabab G, Boissière-Michot F, Mollevi C, et al. Diversity of Tumor-Infiltrating,  $\gamma\delta$  T-Cell Abundance in Solid Cancers. *Cells.* 2020;9(6).  
doi:10.3390/CELLS9061537

193. Chen S, Zha X, Yang L, Li B, Liye Z, Li Y. Deficiency of CD3gamma, delta, epsilon, and zeta expression in T cells from AML patients. *Hematology*. 2011;16(1):31-36. doi:10.1179/102453311X12902908411832
194. Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(1):23-32. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2011.12.004
195. Browning MJ, F. Bodmer W. MHC antigens and cancer: implications for T-cell surveillance. *Curr Opin Immunol*. 1992;4(5):613-618. doi:10.1016/0952-7915(92)90036-E
196. Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*. 1999;11(1):68-75. doi:10.1097/00001622-199901000-00014
197. María DP, Velázquez J, José D, Huerta López G, Patricia D, Quintana C. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Artículo de revisión*. 26:2017-2056. Accessed September 20, 2022. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx) Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://p://www.medigraphic.com/alergia/>
198. Huang H, Pan XW, Huang Y, et al. Microvascular invasion as a prognostic indicator in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(7):10779. Accessed September 23, 2022. [/pmc/articles/PMC4565255/](http://pmc/articles/PMC4565255/)
199. Grimm M. Prognostic value of clinicopathological parameters and outcome in 484 patients with oral squamous cell carcinoma: microvascular invasion (V+) is an independent prognostic factor for OSCC. *Clin Transl Oncol*. 2012;14(11):870-880. doi:10.1007/S12094-012-0867-2
200. Rodríguez-Perálvarez M, Luong TV, Andreana L, Meyer T, Dhillon AP, Burroughs AK. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: Diagnostic and prognostic variability. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(1):325-339. doi:10.1245/S10434-012-2513-1/FIGURES/4
201. Kim H, Kim M, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Prognostic Significance of Lymphovascular Invasion in Radical Cystectomy on Patients with Bladder

- Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014;9(2):89259. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0089259
202. Mollberg NM, Bennette C, Howell E, Backhus L, Devine B, Ferguson MK. Lymphovascular invasion as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Thorac Surg*. 2014;97(3):965-971. doi:10.1016/J.ATHORACSUR.2013.11.002
203. Heinzlbecker J, Gross-Weege M, Weiss C, et al. Microvascular invasion of testicular nonseminomatous germ cell tumors: implications of separate evaluation of lymphatic and blood vessels. *J Urol*. 2014;192(2):593-599. doi:10.1016/J.JURO.2014.02.2569
204. Murphy CC, Gerber DE, Pruitt SL. Prevalence of Prior Cancer Among Persons Newly Diagnosed With Cancer: An Initial Report From the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *JAMA Oncol*. 2018;4(6):832-836. doi:10.1001/JAMAONCOL.2017.3605
205. Thiels CA, Naik ND, Bergquist JR, et al. Survival following synchronous colon cancer resection. *J Surg Oncol*. 2016;114(1):80-85. doi:10.1002/JSO.24258
206. Borda A, Martínez-Peñuela JM, Muñoz-Navas M, Prieto C, Betés M, Borda F. [Synchronous neoplastic lesions in colorectal cancer. An analysis of possible risk factors favouring presentation]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008;100(3). doi:10.4321/S1130-01082008000300003
207. Liu X, Goldblum JR, Zhao Z, et al. Distinct clinicohistologic features of inflammatory bowel disease-associated colorectal adenocarcinoma: in comparison with sporadic microsatellite-stable and Lynch syndrome-related colorectal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(8):1228-1233. doi:10.1097/PAS.0B013E318253645A
208. Andreu-Ballester JC, Amigó-García V, Catalán-Serra I, et al. Deficit of gammadelta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56(9):2613-2622. doi:10.1007/S10620-011-1636-8
209. Poggi A, Zocchi MR. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Archivum*

- Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2006 54:5. 2006;54(5):323-333.  
doi:10.1007/S00005-006-0038-7
210. Contreras DN, Krammer PH, Potkul RK, et al. Cervical cancer cells induce apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunother.* 2000;23(1):67-74.  
doi:10.1097/00002371-200001000-00009
211. Alexander AAZ, Maniar A, Cummings JS, et al. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+  $\gamma\delta$  T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4232-4240. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4912
212. Compton C. Pathologic prognostic factors in the recurrence of rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2002;2(3):149-160. doi:10.3816/CCC.2002.N.020
213. Blenkinsopp WK, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G, Fielding LP. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol.* 1981;34(5):509-513. doi:10.1136/JCP.34.5.509
214. Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig Dis.* 1999;17(2):67-79. doi:10.1159/000016908
215. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res.* 2018;11(4):264-273.  
doi:10.14740/GR1062W
216. Papaxoinis K, Triantafyllou K, Sasco AJ, Nicolopoulou-Stamati P, Ladas SD. Subsite-specific differences of estrogen receptor beta expression in the normal colonic epithelium: Implications for carcinogenesis and colorectal cancer epidemiology. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22(5):614-619.  
doi:10.1097/MEG.0b013e328335ef50
217. Roig CB, Morales Suárez-Varela MM, Molins Palau C, et al. Adenocarcinoma colorrectal: factores pronósticos de supervivencia en el tratamiento adyuvante con 5-Fluorouracilo-Levamisol (5FU-Lev). 2004;27(8):490-498.

218. Zhang M, Lu X, Wei C, Li X. Association between  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cell subsets and clinicopathological characteristics in patients with breast cancer. *Oncol Lett*. 2020;20(6). doi:10.3892/OL.2020.12188
219. Girard P, Charles J, Cluzel C, et al. The features of circulating and tumor-infiltrating  $\gamma\delta$  T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome. *Oncoimmunology*. 2019;8(8). doi:10.1080/2162402X.2019.1601483

## 9 ANEXOS



## Hoja de Información al Paciente y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

### **1. Título del estudio: Apoptosis linfocitaria según receptor TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$ en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon.**

Investigadores responsables: Dr. Juan Carlos Andreu-Ballester (Jefe Unidad Investigación, Hospital Arnau de Vilanova) y Dr. Antonio Llombart-Cussac (Jefe de Servicio de Oncología, Hospital Arnau de Vilanova)

### **2. Identificación y descripción del procedimiento**

El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente muestra/s biológica/s de sangre periférica y tejido de colon o recto. La extracción de la muestra se llevará a cabo de la pieza quirúrgica que se le extirpará debido a la presencia de una tumoración que se le ha diagnosticado en este segmento de intestino. Las muestras de sangre periférica serán obtenidas por el procedimiento estándar de venopunción, recogiendo un total de 3 tubos (16,5 mL) de sangre. Las muestras se procesarán en el Laboratorio de Hematología del Hospital Arnau de Vilanova, en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Arnau de Vilanova y en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU-San Pablo de Madrid.

### **3. Objetivo**

Lo que se pretende con dicho proyecto de investigación es mejorar el conocimiento sobre la naturaleza de los tumores colo-rectales, como el que usted padece. Si confirmamos nuestra hipótesis de estudio, podríamos crear herramientas que nos ayudaran a definir mejor pronóstico de nuestros pacientes, generar nuevos fármacos o estrategias para el tratamiento de esta enfermedad e incluso actuar de forma profiláctica sobre la generación de un gran número de estos casos. Los linfocitos T- $\gamma\delta$  han demostrado ser imprescindibles para la defensa de nuestro organismo frente a infecciones y tumores, siendo utilizados como terapia para distintos tumores y específicamente en cáncer de colon. La apoptosis es una forma fisiológica de muerte celular, que juega un papel importante en la eliminación de células tumorales. Del mismo modo es un mecanismo de regulación de las células inmunes. Por lo que su

## Hoja de Información al Paciente y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

valoración sobre los linfocitos T sería de vital importancia para comprender su relación con el proceso de evasión inmunológica del tumor.

### **4. Condiciones de la donación**

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, podrán ayudar en el futuro a pacientes diagnosticados de cáncer colon o recto.

Las muestras de los tejidos y/o sangre que usted dona no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran.

### **5. Consecuencias previsibles de su realización**

Se podría dar la circunstancia de ser contactado/a con el fin de recabar nueva información sobre su situación o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o rechazar dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del centro FUTUROS CAMBIOS DE DIRECCIÓN y números de TELÉFONO, ya que es la única vía para poder contactar con usted.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud derivada del desarrollo de los proyectos de investigación y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, puede solicitar la información relativa a su salud derivada del estudio de las muestras donadas. Para ejercer este derecho, puede dirigirse al Servicio de Investigación del Hospital Arnau de Vilanova.

El trabajo en el que se le propone participar ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Arnau de Vilanova con una duración prevista de 36 meses.

### **6. Derecho de revocación del consentimiento**

## Hoja de Información al Paciente y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas (proceso por el cual no es posible establecer relación entre un dato o muestra y el sujeto al que se refiere). Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

### **7.Riesgos**

Los efectos indeseables que pueden presentarse están relacionados con las complicaciones que se le indican en el consentimiento correspondiente a la endoscopia que se le va a llevar a cabo. La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

La obtención de esta muestra no conlleva modificaciones en el tratamiento que usted va a recibir y por consiguiente, no hay riesgo asociado por la donación.

### **8.Protección de datos personales y confidencialidad**

Los datos personales y de salud obtenidos de su historia clínica o equivalente serán incorporados y tratados en una base de datos que cumple con las garantías que establece la legislación sanitaria y sobre protección de datos de carácter personal.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

Es posible que en el desarrollo de un proyecto de investigación se genere mucha información genética de sus muestras. Si los resultados fueran relevantes desde el punto

## Hoja de Información al Paciente y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión en bases científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

Podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, para lo cual tiene que dirigirse al Servicio de Investigación del Hospital Arnau de Vilanova. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Investigador responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con el personal investigador en los servicios de Oncología, cirugía o la unidad de investigación del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia (teléfono: 961 976 119) o en correo electrónico: [jcandreu@ono.com](mailto:jcandreu@ono.com).

Finalizados los análisis propios del estudio, si quedara muestra remanente, ésta seguirá almacenada en las instalaciones del hospital para posibles análisis futuros relacionados con este, hasta el fin de las existencias, si no existe una revocación del presente consentimiento.

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO - CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE**

Título del estudio: Apoptosis linfocitaria según receptor TCR-  $\alpha\beta$  y TCR-  $\gamma\delta$  en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon.

Investigadores responsables: Dr. Juan Carlos Andreu-Ballester (Jefe Unidad Investigación, Hospital Arnau de Vilanova) y Dr. Antonio Llombart-Cussac (Jefe de Servicio de Oncología, Hospital Arnau de Vilanova)

Yo (Nombre y Apellidos):

.....

## Hoja de Información al Paciente y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

1. Declaro que he leído la Hoja de Información al paciente sobre el estudio citado y acepto participar en él.
2. Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al Paciente y una copia de este Consentimiento Informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos del mismo.
3. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción. He hablado con el profesional sanitario informador:  
  
.....
4. Sé que se mantendrá la confidencialidad de mis datos.
5. El consentimiento lo otorgo de manera voluntaria y sé que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento del mismo, por cualquier razón.
6. Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto de Investigación que se me ha explicado y sé que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento del mismo, por cualquier razón y sin que tenga ningún efecto sobre mi tratamiento médico futuro.

DOY

NO DOY

Mi consentimiento para la participación en el estudio propuesto

DOY

NO DOY

Mi consentimiento para la anonimización de mis muestras

**Hoja de Información al Paciente y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.**

DOY

NO DOY

Mi consentimiento para la incorporación de las muestras a la Colección/Biobanco (táchese lo que no proceda).

Fecha:

Firma del Paciente:

Hago constar que he explicado las características y el objetivo del estudio y sus riesgos y beneficios potenciales a la persona cuyo nombre aparece escrito más arriba. Esta persona otorga su consentimiento por medio de su firma fechada en este documento

Fecha:

Firma del Investigador o la persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento:

## Hoja de Información al Donante y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

### **1. Título del estudio: Apoptosis linfocitaria según receptor TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$ en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon.**

Investigadores responsables: Dr. Juan Carlos Andreu-Ballester (Jefe Unidad Investigación, Hospital Arnau de Vilanova) y Dr. Antonio Llombart-Cussac (Jefe de Servicio de Oncología, Hospital Arnau de Vilanova)

### **2. Identificación y descripción del procedimiento**

El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente muestra/s biológica/s de sangre periférica y tejido de colon o recto. La extracción de la muestra de tejido se llevará a cabo en endoscopias de prevención de cáncer de colon y cuyos tejidos sean normales. Las muestras de sangre periférica serán obtenidas por el procedimiento estándar de venopunción, recogiendo un total de 3 tubos (16,5 mL) de sangre. Las muestras se procesarán en el Laboratorio de Hematología del Hospital Arnau de Vilanova, en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Arnau de Vilanova y en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU-San Pablo de Madrid.

### **3. Objetivo**

Lo que se pretende con dicho proyecto de investigación es mejorar el conocimiento sobre la naturaleza de los tumores colo-rectales, y para ello necesitamos comparar tejidos con tumor con tejidos sanos. Si confirmamos nuestra hipótesis de estudio, podríamos crear herramientas que nos ayudaran a definir mejor pronóstico de nuestros pacientes, generar nuevos fármacos o estrategias para el tratamiento de esta enfermedad e incluso actuar de forma profiláctica sobre la generación de un gran número de estos casos. Los linfocitos T- $\gamma\delta$  han demostrado ser imprescindibles para la defensa de nuestro organismo frente a infecciones y tumores, siendo utilizados como terapia para distintos tumores y específicamente en cáncer de colon. La apoptosis es una forma fisiológica de muerte celular, que juega un papel importante en la eliminación de células tumorales. Del mismo modo es un mecanismo de regulación de las células inmunes. Por

## Hoja de Información al Donante y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

lo que su valoración sobre los linfocitos T sería de vital importancia para comprender su relación con el proceso de evasión inmunológica del tumor.

### **4. Condiciones de la donación**

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, podrán ayudar en el futuro a pacientes diagnosticados de cáncer colon o recto.

Las muestras de los tejidos y/o sangre que usted dona no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran.

### **5. Consecuencias previsibles de su realización**

Se podría dar la circunstancia de ser contactado/a con el fin de recabar nueva información sobre su situación o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o rechazar dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del centro FUTUROS CAMBIOS DE DIRECCIÓN y números de TELÉFONO, ya que es la única vía para poder contactar con usted.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud derivada del desarrollo de los proyectos de investigación y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, puede solicitar la información relativa a su salud derivada del estudio de las muestras donadas. Para ejercer este derecho, puede dirigirse al Servicio de Investigación del Hospital Arnau de Vilanova.

El trabajo en el que se le propone participar ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Arnau de Vilanova con una duración prevista de 36 meses.

### **6. Derecho de revocación del consentimiento**

## Hoja de Información al Donante y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas (proceso por el cual no es posible establecer relación entre un dato o muestra y el sujeto al que se refiere). Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

### **7.Riesgos**

Los efectos indeseables que pueden presentarse están relacionados con las complicaciones que se le indican en el consentimiento correspondiente a la endoscopia que se le va a llevar a cabo. La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días.

### **8.Protección de datos personales y confidencialidad**

Los datos personales y de salud obtenidos de su historia clínica o equivalente serán incorporados y tratados en una base de datos que cumple con las garantías que establece la legislación sanitaria y sobre protección de datos de carácter personal.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

Es posible que en el desarrollo de un proyecto de investigación se genere mucha información genética de sus muestras. Si los resultados fueran relevantes desde el punto de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión

## Hoja de Información al Donante y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

en bases científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

Podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, para lo cual tiene que dirigirse al Servicio de Investigación del Hospital Arnau de Vilanova. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Investigador responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con el personal investigador en los servicios de Oncología, cirugía o la unidad de investigación del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia (teléfono: 961 976 119) o en correo electrónico: [jcandreu@ono.com](mailto:jcandreu@ono.com).

Finalizados los análisis propios del estudio, si quedara muestra remanente, ésta seguirá almacenada en las instalaciones del hospital para posibles análisis futuros relacionados con este, hasta el fin de las existencias, si no existe una revocación del presente consentimiento.

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO - CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL DONANTE**

Título del estudio: Apoptosis linfocitaria según receptor TCR-  $\alpha\beta$  y TCR-  $\gamma\delta$  en sangre periférica de pacientes con cáncer de colon.

Investigadores responsables: Dr. Juan Carlos Andreu-Ballester (Jefe Unidad Investigación, Hospital Arnau de Vilanova) y Dr. Antonio Llombart-Cussac (Jefe de Servicio de Oncología, Hospital Arnau de Vilanova)

Yo (Nombre y Apellidos):

.....

## Hoja de Información al Donante y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

1. Declaro que he leído la Hoja de Información al donante sobre el estudio citado y acepto participar en él.
2. Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al Donante y una copia de este Consentimiento Informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos del mismo.
3. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción. He hablado con el profesional sanitario informador:  
  
.....
4. Sé que se mantendrá la confidencialidad de mis datos.
5. El consentimiento lo otorgo de manera voluntaria y sé que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento del mismo, por cualquier razón.
6. Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto de Investigación que se me ha explicado y sé que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento del mismo, por cualquier razón y sin que tenga ningún efecto sobre mi tratamiento médico futuro.

DOY

NO DOY

Mi consentimiento para la participación en el estudio propuesto

DOY

NO DOY

Mi consentimiento para la anonimización de mis muestras

## Hoja de Información al Donante y Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación.

DOY

NO DOY

Mi consentimiento para la incorporación de las muestras a la Colección/Biobanco (táchese lo que no proceda).

Fecha:

Firma del Donante:

Hago constar que he explicado las características y el objetivo del estudio y sus riesgos y beneficios potenciales a la persona cuyo nombre aparece escrito más arriba. Esta persona otorga su consentimiento por medio de su firma fechada en este documento

Fecha:

Firma del Investigador o la persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento: