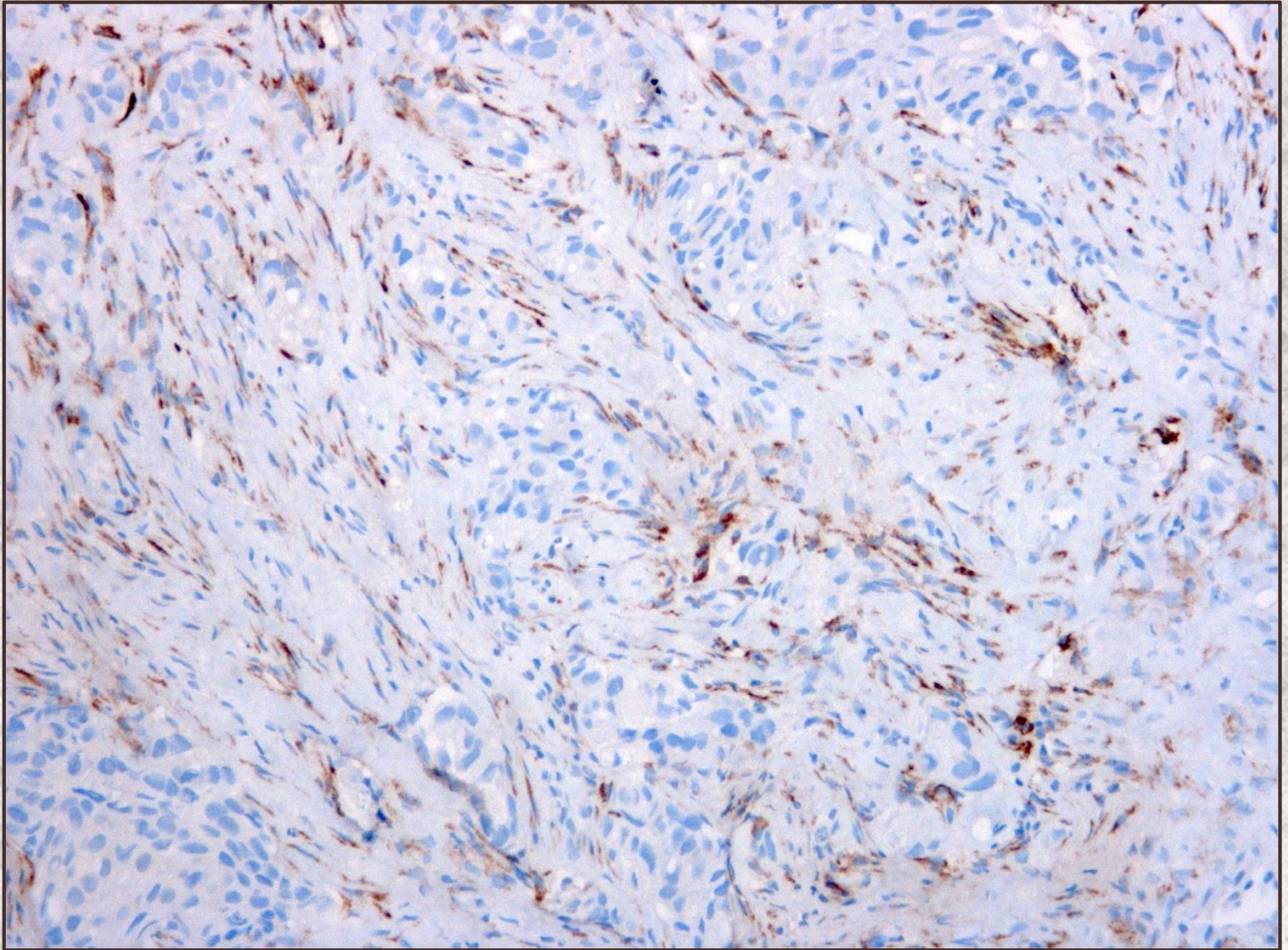


**Tesis Doctoral**  
**Universidad de Cantabria**



**UTILIDAD DEL COL11A1 COMO  
MARCADOR PRONÓSTICO DE  
INFILTRACIÓN TUMORAL**

*Pilar García-Berbel Molina*





# UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**UTILIDAD DEL COL11A1 COMO MARCADOR  
PRONÓSTICO DE INFILTRACIÓN TUMORAL**

AUTOR

**PILAR GARCÍA-BERBEL MOLINA**

DIRECTORES

Dr. Fco. JAVIER FREIRE SALINAS  
Dr. JOSÉ JAVIER GÓMEZ ROMÁN

Santander, Abril 2.017



## UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Memoria presentada por **D<sup>a</sup> María del Pilar García-Berbel Molina** para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

*(Firma del doctorando)*

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Patología Molecular del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Santander, 18 de abril de 2017

*(Firma del Director de la Tesis Doctoral)*

Fco. Javier Freire Salinas

José Javier Gómez Román



*A mis Padres*  
*Carmen y Antonio*  
*Vuestras enseñanzas, mi guía*





Es muy difícil condensar en unas pocas palabras el inmenso agradecimiento que me gustaría expresar de forma muy especial al Dr. Gómez Román por su gran ayuda y confianza en mí, siempre con una actitud positiva, unas palabras de ánimo y una sonrisa en la cara. Gracias por dejarme trabajar contigo, es una suerte tener un “*gran jefe abuelo cebolleta*”. Al Dr. Freire Salinas, sin él no habría sido posible realizar ésta tesis doctoral, MUCHÍSIMAS GRACIAS, lo conseguimos!!!!

Agradecer al Hospital Marqués de Valdecilla en especial al departamento de Anatomía Patológica por permitirme el uso de las instalaciones y sus recursos. A las Dras. Pilar García Arranz, Ainara Azueta y las “resis” Emma Linares y Steliana Racean por ayudarme en la selección e interpretación de los casos.

A Oncomatryx, y de forma muy especial a Saioa, por la cesión de los anticuerpos y el tiempo que me habéis dedicado.

No puedo dejar de agradecer al CIMA (Centro de Investigación Médica Aplicada) y la Universidad de Navarra por la formación que recibí durante cuatro años. Gracias a vosotros me formé como investigadora. Gracias Guillermo Zalba por tus enseñanzas y por acogerme en tu laboratorio. Gracias Idoia Rodríguez por todo lo que ayudaste con los experimentos y por dejarme formar parte de tu familia. A Kristina Sainz muchas gracias

por todo lo que me enseñaste y me ayudaste de “extrangis” en tu laboratorio y sobre todo por tu amistad. Que buenos recuerdos me llevé de allí, sin vosotros mi estancia en Pamplona habría sido muy dura.

A mi familia de Santander Arvilla-Maldonado, especialmente a la matriarca, Lourdes, por atender mis desvaríos pretésicos.

A mis padres, Antonio y Carmen, he llegado aquí gracias a vosotros, a vuestro esfuerzo y a vuestro ejemplo del trabajo bien hecho y acabado, por fin puedo terminar otra etapa. Por vuestra ayuda y vuestro inmenso cariño. MUCHAS GRACIAS.

A mi hermanos, Coco, Nono y Lucía. Y mis sobris Lucía, Luís y Carmen.

A Javi, sin ti no habría sido posible, por estar ahí y sufrir conmigo. MUCHAS GRACIAS. Y a mis niños Pablo, Pilar y Álvaro por lo bien que se han portado en estos meses tan duros. Me habéis ayudado mucho sin saberlo. Sois mis cuatro soles.

## ***ÍNDICE***



## Índice

### Contenido

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| <b>ÍNDICE</b> .....                                               | 11 |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                                         | 17 |
| Breve reseña histórica.....                                       | 19 |
| Etiología y clasificación del cáncer .....                        | 23 |
| Compuestos químicos:.....                                         | 24 |
| Carcinógenos físicos:.....                                        | 24 |
| Agentes biológicos: .....                                         | 25 |
| Biología molecular del cáncer .....                               | 26 |
| Autosuficiencia en el crecimiento .....                           | 27 |
| Insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento.....        | 28 |
| Evasión de la apoptosis y capacidad de replicación ilimitada..... | 28 |
| Capacidad angiogénica y metastásica.....                          | 29 |
| Transición Epitelio-Mesénquima.....                               | 30 |
| Colágeno XI alfa 1 .....                                          | 33 |
| Problemas diagnósticos en cáncer .....                            | 35 |
| Cáncer de Pulmón:.....                                            | 37 |
| Cáncer de mama: .....                                             | 38 |
| Cáncer de colon: .....                                            | 39 |
| Cáncer renal: .....                                               | 40 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| Cáncer de ovario .....             | 41 |
| Cáncer de vejiga .....             | 42 |
| Melanoma .....                     | 42 |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> ..... | 45 |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....    | 49 |
| Cáncer de Mama .....               | 52 |
| Cáncer de Colon .....              | 52 |
| Cáncer de Riñón .....              | 53 |
| Cáncer de Vejiga: .....            | 53 |
| Melanoma .....                     | 53 |
| Cáncer de Ovario .....             | 54 |
| Cáncer de Pulmón.....              | 54 |
| Técnicas Inmunohistoquímicas ..... | 54 |
| Estadística .....                  | 55 |
| <b>RESULTADOS</b> .....            | 57 |
| Cáncer Mama.....                   | 60 |
| Cáncer Colon: .....                | 64 |
| Cáncer Renal.....                  | 66 |
| Cáncer Vejiga .....                | 70 |
| Melanoma .....                     | 72 |
| Cáncer de Ovario .....             | 73 |

|                                                               |            |
|---------------------------------------------------------------|------------|
| Cáncer de Pulmón.....                                         | 74         |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>                                         | <b>77</b>  |
| Colágeno XI alfa 1 como marcador de infiltración tumoral..... | 80         |
| Cáncer de Mama .....                                          | 83         |
| Cáncer de Colon .....                                         | 85         |
| Cáncer de Riñón .....                                         | 87         |
| Cáncer de Vejiga.....                                         | 89         |
| Melanoma: .....                                               | 90         |
| Cáncer de Ovario .....                                        | 92         |
| Cáncer de Pulmón.....                                         | 93         |
| COL11A1 como marcador mesenquimal y de TEM.....               | 96         |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>                                     | <b>99</b>  |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>                                     | <b>103</b> |





# ***INTRODUCCIÓN***



## Introducción

### Breve reseña histórica

El cáncer es, sin duda, un problema de salud pública global y, a pesar de los esfuerzos realizados, continúa mostrando elevadas cifras de morbilidad y mortalidad en la actualidad<sup>1</sup>. Debido a su carácter de enfermedad de base genética y a la multitud de órganos y sistemas que pueden encontrarse afectados, se ha constituido en un punto de confluencia de todas las especialidades biomédicas. Y su investigación ha generado y genera diariamente toneladas de información.

El cáncer a pesar de recibir un único nombre genérico, no se trata de una única enfermedad, si no que se trata de más de 250 enfermedades diferentes, caracterizadas por la característica común de un crecimiento desproporcionado y descontrolado con capacidad de diseminación a distancia.

El crecimiento celular normal del cuerpo (formado por trillones de células) es un proceso complejo y ordenado. Sin embargo, en el cáncer, debido a alteraciones en los mecanismos reguladores que dirigen el comportamiento de la diferenciación, crecimiento, muerte celular programada y proliferación entre otros, las células crecen y se dividen de una forma descontrolada, y en última instancia se propagan por todo el organismo, interfiriendo en la función de los tejidos y de los órganos sanos<sup>2</sup>.

La primera referencia escrita que se tiene acerca de la existencia de tumores, se encuentra en el Papiro de Ebers (1500 años a.C; Figura 1), en el que los antiguos egipcios ya hablaban de tumores superficiales probablemente de origen mamario y daban recomendaciones de no intentar curarlos<sup>3</sup>. El término cáncer se introduce por primera vez en la antigua Grecia. Hipócrates (460-375 a.C) describe diversos tipos de tumores y utiliza dicho término al comparar la vascularización de los tumores con las patas de un cangrejo (*karkinos*)<sup>4</sup> si bien no se conoce de manera fehaciente si el nombre pudiera deberse asimismo a la consistencia aumentada del tejido mamario neoplásico que asemejaba un caparazón. Varios siglos después, Galeno (131-201 d.C.) propone la primera teoría etiológica del cáncer, dentro de su concepción general de la enfermedad de los cuatro humores, considerando que el cáncer pudiera corresponder a una alteración del humor negro<sup>5</sup>. La “novedad” de la hipótesis galénica se encuentra en que describe tres conceptos como son la “causa procatactica” o noxa externa que produce una enfermedad y que actúa sobre una predisposición individual o “causa sinéctica” para producir como consecuencia el “pathos” o enfermedad. Esta teoría como vemos no se aleja en gran medida de las que se exponen actualmente para considerar el desarrollo del cáncer.



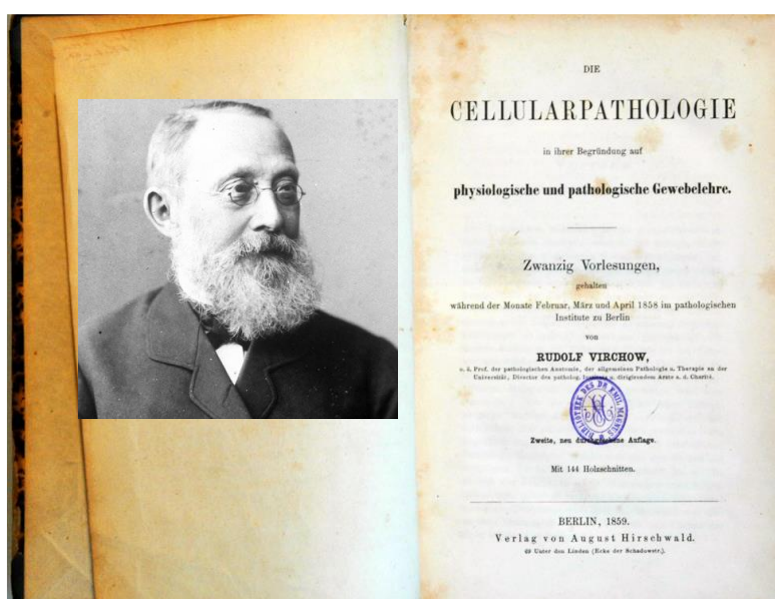
Figura 1: Papiro de Ebers

Durante el periodo medieval Europa, se aleja del naturalismo científico griego por considerarlo pagano y de hecho existe una prohibición expresa de la realización de autopsias, lo que produce una deceleración en el conocimiento médico. Las escasas documentaciones de casos clínicos medievales no muestran evidencias adecuadas de la prevalencia y el tratamiento del cáncer, se describen episodios aislados y la terapéutica continúa siendo herbolaria y local<sup>6</sup>.

No es hasta el siglo XVIII, con el Renacimiento, cuando se comienza a profundizar en el conocimiento y clasificación de las patologías tumorales. Podríamos decir parafraseando a Pedro Laín Entralgo que la medicina moderna es en gran medida un regalo del microscopio. De hecho, el descubrimiento de este instrumento por Van Leewenhoeck en 1712 provocó una gran revolución en el conocimiento de la enfermedad si bien tardó cerca de 200 años en poder aplicarse a la ciencia médica que se encontraba en un estado pretécnico.

En 1775 Sir Percival Pott señaló la relación existente entre cáncer del escroto y el polvo de carbón que sufrían de manera casi endémica los deshollinadores<sup>7</sup>. Más tarde, en 1855 Rudolph Virchow, quien había demostrado que toda célula proviene de otra célula en sus trabajos de patología celular (Figura 2), sugirió que las células cancerosas debían, también, derivar de otras células<sup>8</sup> implantando el concepto de “neoplasia” como diagnóstico y provocando el final de tratamientos heredados de la etapa hipocrática que se aplicaban con escaso conocimiento científico. Su discípulo Julius Cohnheim desarrollaría posteriormente la idea y hoy es reconocido como el autor de la teoría de la células embrionarias durmientes, basándose en la gran similitud en la forma de proliferación de ambos tipos de tejido (aunque naturalmente en el cáncer la diferenciación se encuentra alterada).

Diversos hitos posteriores marcaron el entendimiento que tenemos en la actualidad sobre esta enfermedad. Johannes Müller observó el carácter desordenado de las células cancerosas. Henri Le Fran observó la diseminación por los nódulos linfáticos y de allí a la circulación general, mientras que Wilhelm Waldeyer mostró en 1800 el rol de los émbolos sanguíneos pasando del tumor a los vasos y linfáticos.



*Figura 2: Rudolph Virchow y su manual de Patología Celular*

Ya en el siglo XX, la investigación en oncología da un salto cualitativo, empezando en 1911 cuando Peyton Rous aisló el virus del sarcoma aviar y lo trasplantó a otros animales a través de un preparado filtrado carente de células, iniciando así la teoría del origen viral de algunos tumores. Mientras, Dennis Burkitt en África central encontró un linfoma que solo existía en ciertos climas y ambientes por lo que sugirió el origen de este tumor en un virus transmitido por mosquitos. Años después se estableció el carácter oncogénico del virus de Epstein Barr, de la familia de los herpes virus, como iniciador de tipos varios tipos tumorales como, por ejemplo, el propio linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo<sup>9</sup>.

Desde entonces hasta ahora son multitud los estudios y trabajos sobre el conocimiento y tratamiento del cáncer, sin embargo esta patología sigue siendo una gran desconocida y los éxitos que se han obtenido en multitud de ocasiones en condiciones experimentales no han conseguido ser transmitidos a la rutina asistencial por diferentes causas.

### Etiología y clasificación del cáncer

En el estudio de la etiología del cáncer se plantean de forma muy general dos grandes causas: las exógenas, responsables del 80-90 % de todas las neoplasias, y las endógenas responsables del 10 al 20% restante<sup>10</sup>. Estas últimas, a diferencia de las primeras, ocurren independientes a cualquier incidencia externa. Pueden ser mutaciones espontáneas debidas a fallos en los procesos biológicos naturales de la célula (como en la reparación del ADN) o; por herencia, es decir, transmisión de mutaciones en genes que se transmiten entre generaciones.



Los carcinógenos exógenos (cualquier agente capaz de incrementar la incidencia de las lesiones neoplásicas) son los factores principales de la aparición de tumores. Estos pueden ser químicos, físicos o biológicos.

#### Compuestos químicos:

El uso cotidiano de distintos medicamentos<sup>11,12</sup>, alimentos y aditivos alimenticios<sup>13</sup>, productos industriales y del hogar<sup>14</sup>, el tabaquismo<sup>15,16</sup>, la ingestión de bebidas alcohólicas<sup>17</sup> y de estimulantes<sup>18</sup> o la variada exposición ocupacional<sup>19,20</sup>, son algunos de los factores a los que nos vemos expuestos a diario y que pueden aumentar la incidencia del cáncer.

Estos carcinógenos químicos pueden ser de naturaleza genotóxica, (cuando causan un daño directo en el ADN) y por tanto iniciadores del proceso neoplásico<sup>2</sup>, o no genotóxicos cuando su influencia media en la promoción de un tumor ya iniciado<sup>21</sup>.

#### Carcinógenos físicos:

Los cánceres causados por agentes físicos son en su mayoría debidos a radiaciones (tanto ionizantes, como no ionizantes)<sup>22,23</sup>. Las últimas están representadas básicamente por las radiaciones ultravioletas que como presentan bajo contenido energético no pueden atravesar la materia viviente ni generar radicales libres, pero en cambio interactúa con el ADN de las células más superficiales induciendo formación de dímeros entre dos bases timinas vecinas e interfiriendo así con el proceso normal de replicación. Las ionizantes (radiación gamma, X, neutrones y partículas cargadas) poseen en cambio un elevado poder energético y logran atravesar la materia viva ionizando a su paso átomos y generando radicales libres, nocivos para la célula.

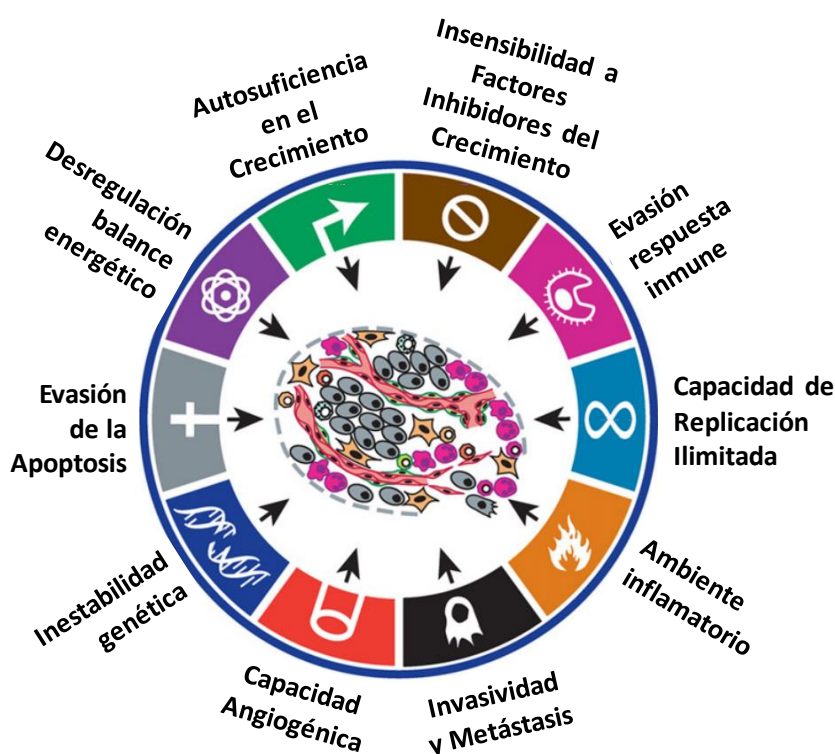
#### Agentes biológicos:

Hace más de cien años los investigadores comenzaron a considerar la posibilidad de que los tumores pudieran ser causados por virus u otros agentes infecciosos. Hoy en día ya se sabe que los patógenos más comunes causantes de cáncer son los virus de ADN. Estos, se transmiten entre células infectándolas e incluyendo su material genético en la maquinaria de producción celular. Estos virus poseen oncogenes virales capaces de transformar las células normales en tumorales (evitando su muerte para favorecer su replicación)<sup>24</sup>. El virus más reconocido de todos los cancerígenos es el Virus del Papiloma Humano (VPH), un pequeño virus que causa tumores epiteliales y del que se han descubierto más de 105 genotipos con un poder oncogénico relacionado con el tipo y las secuencias de alguno de sus genes<sup>25</sup>. Otros virus oncogénicos son los de la hepatitis B y C (cáncer de hígado<sup>26</sup>), el virus de Epstein- Barr (faringe<sup>27</sup>, linfoma Hodgkin<sup>28</sup>) o el virus herpes tipo 8 (sarcoma de Kaposi<sup>29</sup>).

El cáncer se clasifica según el tejido a partir del cual las células se originan. El pronóstico está, en gran medida, influenciado por el tipo de tumor y la extensión de la enfermedad. Frecuentemente, en estados iniciales, los síntomas pueden ser interpretados como procedentes de otras patologías. Aunque las primeras manifestaciones de la enfermedad provienen de síntomas, análisis de sangre o radiografías, el diagnóstico definitivo requiere un examen anatomopatológico. En términos genéricos el 90 % de los tumores malignos son generados por células epiteliales y se denominan carcinomas. Cuando el tumor se produce en tejidos de origen mesenquimal (tejido conectivo o muscular) y es de características malignas se denomina sarcoma. Las leucemias, linfomas, y mielomas son tumores de origen hemático y los neuroblastomas y gliomas, por ejemplo, derivan del sistema nervioso.

## Biología molecular del cáncer

El cáncer es un proceso evolutivo; para que una célula cualquiera pueda dar lugar a un tumor ha de sufrir ciertos cambios progresivos. Estas alteraciones necesarias para la carcinogénesis se recogen en un artículo publicado por Hanahan y Weinberg<sup>21</sup> en el que se definen las seis alteraciones claves necesarias para que las células normales progresen hasta un tumor maligno. Estas alteraciones implican autosuficiencia en el crecimiento, insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, capacidad de replicación ilimitada, capacidad angiogénica y capacidad de invasión y metástasis (Figura 3,). Además, este artículo (que es una actualización sobre una versión previa del año 2000<sup>2</sup>) presenta 4 características del ambiente tumoral que facilitan su crecimiento y progresión hacia una neoplasia infiltrante, la inflamación, la evasión de la respuesta inmune, un estado de inestabilidad genética y un desbalance energético<sup>21</sup>.



**Figura 3. Capacidades necesarias para la carcinogénesis.**  
Capacidades que una célula debería adquirir para poder progresar hacia un tumor maligno. Adaptada de Hanahan y Weinberg, 2.011.<sup>21</sup>

La célula va acumulando estas “capacidades” de un modo progresivo. De ahí que los estadios iniciales de un proceso neoplásico sean un periodo clave para la evolución del tumor, y por tanto un ambiente en el que se puede centrar la búsqueda de marcadores de detección precoz y estrategias de tratamiento.

Siguiendo el artículo publicado por Hanahan y Weinberg<sup>21</sup>, las alteraciones moleculares más frecuentes en la patología tumoral se pueden resumir según las “capacidades” que una célula debe adquirir para convertirse en una neoplasia maligna. A continuación mencionamos estas capacidades en referencia a algún ejemplo importante.

#### Autosuficiencia en el crecimiento

Las células normales requieren señales externas de crecimiento para comenzar su ciclo replicativo, pero es indispensable para una célula tumoral la capacidad de crecer en ausencia de dichas señales. Para ello es necesario activar las vías de señalización en alguno de sus puntos; ya sea extracelularmente secretando factores autocrinos que actúan en los receptores de la misma célula, o intracelularmente mediante una activación continua de alguno de los elementos de vías reguladoras del crecimiento.

Algunos genes que controlan las vías de activación de la proliferación se denominan proto-Oncogenes. Cualquier variación que induzca la activación constitutiva de estos genes los convierte en oncogenes; es decir, genes que confieren a la célula capacidad de crecimiento independiente de señales externas. Ejemplos importantes de familias con genes oncogénicos son los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)<sup>30</sup>, la vía de Ras<sup>31</sup>/Raf<sup>32</sup>/Erk<sup>33</sup>, la vía del fosfatidil inositol/AKT<sup>34</sup>, la familia STAT<sup>35</sup>, Myc<sup>36</sup>, etc...

### Insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento

Para mantener el equilibrio en el crecimiento, las células normales son sensibles a ciertas señales que conllevan un freno en la proliferación o inducen la muerte celular. La célula tumoral sin embargo, no debe responder a este tipo de factores con el fin de mantener un crecimiento constante. Algunos de estos factores implicados en el bloqueo de la proliferación o la inducción de la apoptosis se han catalogado clásicamente como Genes Supresores Tumorales, y su inactivación o pérdida es un evento frecuente en la evolución neoplásica.

La “teoría de los dos impactos”<sup>37</sup> propone un mecanismo de inactivación de estos genes basado en una doble inhibición; por un lado por ejemplo, puede haber una pérdida o mutación del gen en un alelo, y por otro un control epigenético con inhibición de la expresión en el otro alelo. La doble inactivación es necesaria ya que aunque sólo se exprese un alelo, la proteína generada es suficiente para llevar a cabo su función en la inhibición de la proliferación o la inducción de la apoptosis. Entre los genes supresores más relevantes encontramos p53<sup>38</sup>, CDKN2A<sup>39</sup>, retinoblastoma<sup>40</sup>, STK11<sup>41</sup> o BRCA<sup>42</sup> entre otros.

### Evasión de la apoptosis y capacidad de replicación ilimitada

Evitar la muerte celular programada es una de las estrategias, que junto a la capacidad de replicación ilimitada, confiere la inmortalidad a una célula. El bloqueo de la muerte programada se consigue mediante el bloqueo de las vías implicadas en el control de la apoptosis, como son las mutaciones de p53 comentadas anteriormente o la sobreactivación de BCL2<sup>43</sup>.

La capacidad de replicación ilimitada se puede adquirir, también, inhibiendo la reducción de los telómeros que ocurre con cada división mitótica. La longitud de los

telómeros (secuencias repetidas hexaméricas TTAGGG en los extremos terminales de los cromosomas) tras varias divisiones celulares marca el estado de envejecimiento de una célula. El acortamiento telomérico se debe a la incapacidad de la duplicación completa de estas secuencias en cada división mitótica (hipótesis de Hayflick) y por lo tanto marca el número máximo de divisiones de una célula. En tumores y líneas celulares de cualquier neoplasia maligna se ha detectado una expresión aberrante de la telomerasa que es la enzima capaz de replicar estas secuencias evitando el acortamiento telomérico<sup>44</sup>.

#### Capacidad angiogénica y metastásica.

El tumor requiere oxígeno y nutrientes para su supervivencia. Por ello debe ser capaz de garantizar la presencia de sistemas de vascularización suficientes y, por tanto, para crecer en tamaño debe tener capacidad angiogénica. Con frecuencia las neoplasias sobreexpresan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor). Esta proteína cumple un papel crucial en el reclutamiento y proliferación de células endoteliales impidiendo su muerte por apoptosis para formar nuevos vasos. Asimismo, se ha definido como una diana útil en las nuevas terapias antitumorales<sup>45</sup> generalmente en combinación con agentes quimioterápicos clásicos.

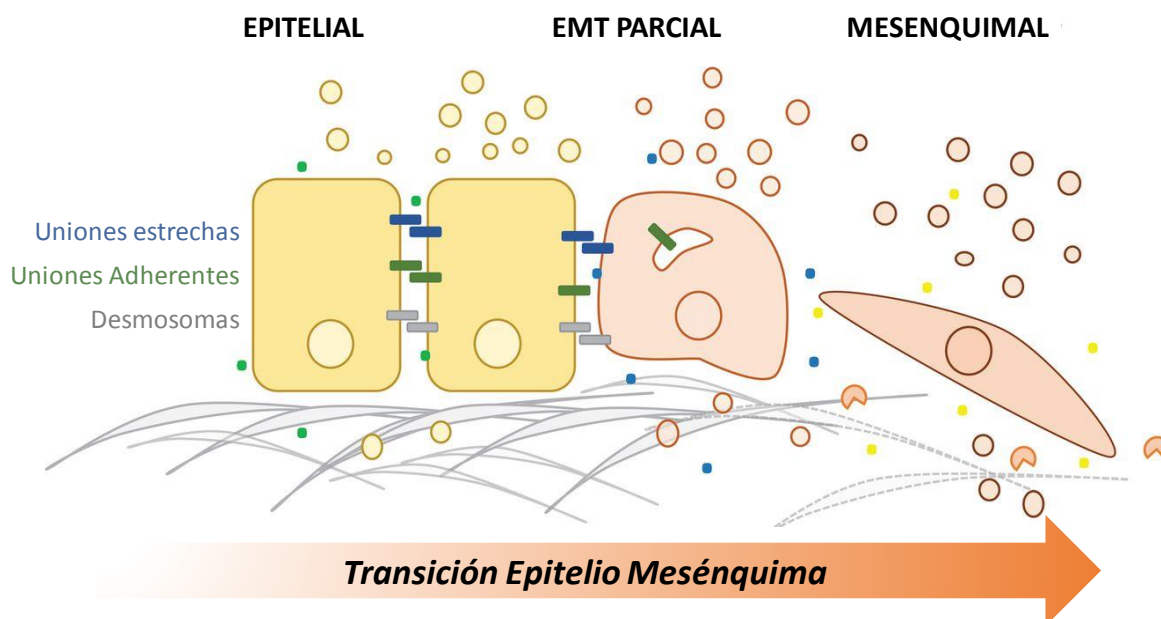
En un punto de la evolución tumoral, las células adquieren la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y de metastatizar a otros órganos. Esta función permite a la célula tumoral establecer otros nichos de crecimiento, asegurando así su supervivencia. Aún no está muy claro el origen de esta capacidad pero se han propuesto mecanismos genéticos y alteraciones en distintas vías (por ejemplo, WNT/TCF<sup>46</sup>), como modificaciones moleculares que facilitan que la célula tumoral adquiera capacidad metastásica.

Aunque el resto de procesos celulares pueden promover la aparición y crecimiento del tumor, es la vía de diseminación y metástasis la que habitualmente mata al paciente<sup>47-</sup>

<sup>49</sup>. Tanto los estadios clínicopatológicos como los tratamientos médicos del cáncer se basan principalmente en la presencia o no de metástasis a distancia, por lo que el estudio de esta capacidad se antoja prioritaria en el conocimiento del cáncer. Aunque aún es un fenómeno pobremente comprendido, parece claro que para que una célula pueda metastatizar debe adquirir una serie de características que le permitan la movilidad y la migración. Este proceso concreto se conoce como Transición Epitelio-Mesénquima, y lleva a células polarizadas con fenotipo epitelial a convertirse en células con fenotipo mesenquimal y, por tanto, con una mayor capacidad de motilidad y una menor unión entre la matriz extracelular y la célula con capacidad de sobrevivir de manera aislada en un entorno hostil.

#### Transición Epitelio-Mesénquima

Con el fin de poder acceder a otros nichos de crecimiento, las células tumorales adquieren capacidad de diseminación a través de los torrentes circulatorios corporales. Para que una célula epitelial consiga estas capacidades, se producen distintas alteraciones que llevan a la activación de un proceso biológico conocido como Transición Epitelio-Mesénquima. Mediante este mecanismo se produce un cambio fenotípico de la célula epitelial basado en alteraciones de adhesión intercelular, de la interacción de la célula con el entorno, una reorganización del citoesqueleto, una degradación de la membrana basal y un reordenamiento de la matriz extracelular (Figura 4).



**Figura 4: Proceso de Transición Epitelio-Mesénquima:**

*Este proceso se caracteriza por una pérdida de las uniones celulares, la reorganización del citoesqueleto y la remodelación de la matriz extracelular*

Estos fenómenos de transición han sido descritos en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario y la regeneración o fibrosis tisular<sup>50</sup>; pero también durante la progresión y metastatización tumoral a través de este mismo fenómeno migratorio después de una reprogramación de células pluripotenciales.

La regulación de este fenómeno se produce mediante la coordinación de procesos moleculares que cooperan en su iniciación y finalización como factores de transcripción, expresión de proteínas de superficie y del citoesqueleto, enzimas que degradan la matriz extracelular y cambios en la expresión del ARNm. Su actividad promoverá modificaciones celulares en un doble sentido: Por un lado, la represión o pérdida de sustancias reguladoras de los complejos de adhesión celular como la E-cadherina y, por otro, modificaciones de filamentos de actina del citoesqueleto hacia citoqueratinas y actomiosina por mediación de una Rho-GTPasa; lo cual se traduce en una desconexión celular del epitelio con un cambio de fenotipo y la propiedad de migración<sup>51</sup>.



Los mecanismos de reparación tisular a través de este programa mantienen analogía con la invasividad tumoral, por cuanto que las células epiteliales responden a una inflamación o daño transformándose en fibroblastos capaces de liberar señales inflamatorias para la regeneración o fibrosis tisular.

Cuando se produce un descontrol en la regulación de esta transición bidireccional las células pueden adquirir un fenotipo maligno y una capacidad infiltrativa por sus propiedades migratorias, manifestada por la degradación de la membrana basal, que explicaría por qué las células del frente invasivo del tumor primario pueden expresar marcadores mesenquimales en lugar de epiteliales como la vimentina, la fibronectina, Twist o distintos colágenos<sup>52,53</sup>.

Existen diferentes vías que pueden desencadenar la activación del fenómeno de TEM como la ruta Src, Ras y diversos factores de crecimiento. TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) a través de la expresión de factores de transcripción representa uno de los principales factores reguladores del programa de Transición Epitelio-Mesénquima<sup>54</sup>, y es especialmente influyente en la relación de la célula tumoral con el microambiente circundante.

La importancia del microambiente tumoral en la progresión del cáncer es ampliamente reconocida<sup>55,56</sup>. El microambiente se compone de una amplia selección de tipos celulares distintos, como células inmunitarias, fibroblastos, células endoteliales y adipocitos, y una matriz extracelular (MEC). La MEC es una red molecular altamente dinámica y compleja que rodea las células dentro de los tejidos. Los componentes de la MEC proporcionan a las células tumorales señales bioquímicas y biomecánicas de ida y vuelta que intervienen en la progresión del cáncer y la metástasis favoreciendo de nuevo mecanismos de Transición Epitelio-Mesenquima<sup>57,58</sup>. La matriz está compuesta por numerosas proteínas que contribuyen a su estructura y función tales como colágenos,

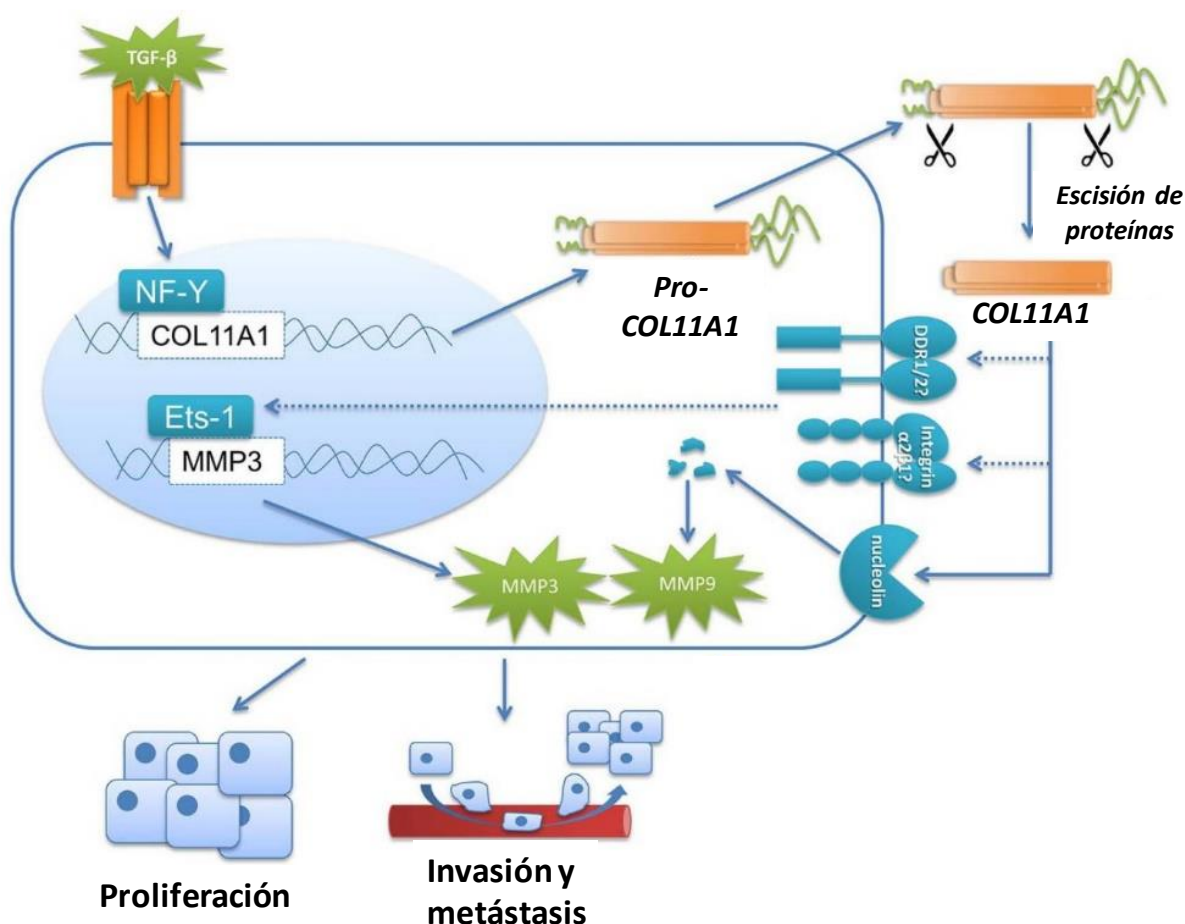
fibronectina, lamininas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos y enzimas de remodelación<sup>59</sup>.

Los colágenos son los principales componentes de la MEC y representan alrededor del 30% de la masa total de proteínas<sup>60</sup>. Durante el proceso de invasividad tumoral, se observan cambios significativos en la composición de los colágenos en la MEC, produciéndose una mayor acumulación de colágenos fibrilares I, III y V mientras que el colágeno tipo IV disminuye<sup>61</sup>. Dentro de todos los tipos de colágeno, en los últimos años, se ha propuesto el papel prioritario del Colágeno XI como impulsor de la invasividad tumoral<sup>62,63</sup>.

### Colágeno XI alfa 1

El colágeno XI, formado por tres cadenas  $\alpha$ , representa un componente escaso pero esencial en el conjunto del colágeno ya que una de sus principales funciones, junto con el colágeno IX, es regular el diámetro de sus fibrillas para estabilizar el crecimiento lateral del colágeno II durante el desarrollo del tejido cartilaginoso embrionario<sup>64</sup>.

La primera descripción del COL11A1 en oncología se dio en una línea de rabdomiosarcoma<sup>65</sup>, aunque posteriormente se ha estudiado en otros muchos tumores como el cáncer de pulmón<sup>66</sup>, mama<sup>67</sup>, páncreas<sup>68</sup>, gástrico<sup>69</sup> y colorrectal<sup>70</sup>, donde parece estar sobreexpresado con respecto al epitelio normal o lesiones inflamatorias. Resulta llamativa su expresión en compañía de genes relacionados con la transición de epitelio a mesénquima<sup>71</sup>. Este concepto apoyaría su papel en la transición de epitelio a mesénquima pues se sabe que el TGF- $\beta$ , como inductor primario de dicha transición, promueve la activación de este tipo de colágeno en las células estromales a través del receptor NF- $\gamma$  (Figura 5)<sup>62,72</sup>.



**Figura 5: COL11A1 en la promoción del cáncer.**

El COL11A1 se expresa por activación de TGF- $\beta$ , a través del factor de transcripción NF-Y. Tras su traducción y procesamiento puede regular la expresión de MMP3. El COL11A1 también se une a la nucleolina que regulan MMP9. En última instancia, el COL11A1 promueve la proliferación celular, invasión y metástasis. Figura adaptada de Raglow et al<sup>62</sup>

La expresión del COL11A1 se asocia a un fenotipo celular del estroma similar a los fibroblastos de la que se desconoce el origen y naturaleza real. No obstante, se ha considerado que las células estromales asociadas al cáncer resultan de la reacción desmoplásica que acompaña a todo proceso neoplásico infiltrativo y derivan de diferentes tipos de progenitores mesenquimales<sup>73</sup>. La confirmación de este concepto apoyaría la relación entre fibrosis del estroma tumoral y el riesgo de metastatización.

Todos estos artículos, apoyan la visión de que la expresión del COL11A1 es un evento particular de la remodelación de la MEC para la invasión, por tanto, su utilización como diagnóstico de infiltración podría ser adecuado.

### Problemas diagnósticos en cáncer

El diagnóstico anatomopatológico a partir de una muestra biológica se considera generalmente el “*gold standar*” para el manejo clínico del paciente. Sin embargo, dicho diagnóstico dista mucho de ser un valor absoluto, ya que existen diversos rasgos histológicos que pueden ser compartidos por lesiones tanto de carácter benigno como maligno, con lo que el diferencial se encuentra en ocasiones en una zona gris donde se originan numerosas complicaciones diagnósticas. Aunque existen criterios muy concretos para la determinación de estas características, la propia naturaleza limitada de la muestra, la heterogeneidad tumoral, y los escasos cambios fenotípicos que en ocasiones muestran las células neoplásicas pueden provocar incertidumbre diagnóstica. Este hecho choca con la necesidad de una clasificación diagnóstica específica de la biopsia para determinar todos los aspectos pronósticos y predictivos asociados a cada tipo tumoral.

La literatura oncológica está repleta de entidades benignas capaces de imitar los patrones tumorales malignos. Debido a que el cáncer es una enfermedad con una supervivencia global bastante pobre y que a menudo implica el tratamiento con cirugía y quimioterapia/radioterapia, evitar no sólo el subdiagnóstico, sino también el sobrediagnóstico del cáncer se convierte en un evento crucial. Un diagnóstico de falso positivo en cáncer puede resultar en un tratamiento agresivo inapropiado con los riesgos asociados de morbilidad y toxicidad, mientras que el diagnóstico de una lesión como falsamente benigna puede conllevar retrasos en la aplicación terapéutica correcta.

Sería imposible catalogar todas las entidades que causan confusión diagnóstica en el ámbito del diagnóstico del cáncer, sin embargo y sabiendo que los procesos metastásicos son los causantes del mayor número de muertes por cáncer<sup>47-49</sup>, la correcta identificación de los fenómenos de infiltración tumoral se antoja imprescindible. Las clasificaciones basadas en el estadiaje TNM así como los tratamientos clínicos actuales se basan, principalmente, para determinar el pronóstico de un tumor en la presencia o no de infiltración y riesgo de enfermedad metastásica, por lo que se requiere un diagnóstico patológico de calidad en la determinación de este rasgo. Sin embargo, por distintos motivos, a veces esa determinación no se puede realizar con la suficiente precisión que se requiere.

La utilización de técnicas de obtención de muestra cada vez menos invasivas es un arma de doble filo, por un lado representa un beneficio evidente para el paciente, por el contrario, a la hora del diagnóstico, las biopsias pequeñas pueden entrañar graves dificultades para la correcta identificación histológica. Son estas biopsias pequeñas las que más problemas causan en el devenir diario del diagnóstico patológico, puesto que por su tamaño, por la zona de captura o, incluso por las características inherentes al proceso de recogida, pueden provocar sesgos muy grandes para el correcto examen microscópico.

Por el volumen de casos anuales, por su mayor mortalidad asociada o por la complejidad de las lesiones existen varios tipos tumorales prioritarios en los que esta dificultad diagnóstica se concentra y por tanto requieren herramientas que ayuden al patólogo en su decisión. A continuación se hará una pequeña presentación de las principales complejidades diagnósticas que se estudiarán en este trabajo de tesis doctoral.

### Cáncer de Pulmón:

Dentro de las neoplasias, el cáncer de pulmón no sólo es de los más frecuentes, sino que es la principal causa de muerte por cáncer en Europa<sup>74</sup> y EEUU<sup>1</sup>. Analizando por sexos, el cáncer de pulmón es por detrás del de próstata la segunda neoplasia en incidencia y la primera en mortalidad entre hombres, mientras que en mujeres ocupa el segundo puesto en incidencia tras el cáncer de mama y de nuevo es el primero en mortalidad<sup>1</sup>.

En un plano anatomopatológico, el cáncer de pulmón presenta numerosos retos diagnósticos en la práctica diaria. Sin embargo, existen dos situaciones que plantean especiales dificultades.

En primer lugar, el diagnóstico diferencial entre lesiones preinvasivas en el parénquima pulmonar distal y el adenocarcinoma *in situ*. Es decir, entre la hiperplasia adenomatosa atípica y el antiguo Carcinoma bronquioloalveolar (actual adenocarcinoma *in situ*). Este problema se prevé que puede aumentar en frecuencia si se llegan a implantar como así parece las políticas de detección precoz de cáncer de pulmón mediante pruebas radiológicas en pacientes seleccionados. Las series publicadas<sup>75</sup> muestran un incremento en la detección de pequeñas lesiones periféricas, generalmente adenocarcinomas que van a ser biopsiadas para diagnóstico histológico y la detección de áreas de infiltración incipiente neoplásica va a adquirir si cabe mayor importancia.

Estas dos lesiones comparten características fenotípicas e inmunofenotípicas con lo que en biopsias por aguja gruesa pueden resultar indistinguibles utilizando las técnicas convencionales. Por otro lado según recogen las guías de diagnóstico las muestras citológicas no son aplicables en este ámbito.<sup>76</sup> Es necesario por tanto el desarrollo de técnicas auxiliares que nos permitan diagnosticar de manera fiable la infiltración incipiente para asegurar la presencia de un adenocarcinoma.

Existe otro ámbito de incertidumbre diagnóstica en el campo de las neoplasias pulmonares y en general del área torácica. El mesotelio que reviste la pleura visceral y parietal es origen de tumores muy agresivos con escasas posibilidades de tratamiento. Los Mesoteliomas malignos difusos son dichas neoplasias que en gran parte de las ocasiones tienen que ver con una exposición profesional al asbesto y de hecho se considera como una enfermedad laboral. Sin embargo, la pleura está sujeta a multitud de estímulos y enfermedades que provocan una respuesta inflamatoria con hiperplasias severas que pueden simular tanto desde el punto de vista clínico como anatomopatológico un mesotelioma. La dificultad de obtener biopsias adecuadas añade un elemento de dificultar a esta área diagnóstica.

Existen muy escasas técnicas auxiliares de ayuda para realizar el diagnóstico diferencial entre hiperplasias mesoteliales que en numerosas ocasiones son autolimitadas y el mesotelioma maligno difuso. Se ha especulado con mutaciones de p53, patrones inmunohistoquímicos de tinción frente al Antígeno epitelial de membrana (EMA) o la expresión de mesotelina o Glut1. Sin embargo, el único elemento fiable a la hora del diagnóstico de malignidad en biopsia pleural es la infiltración de áreas profundas por parte de las células mesoteliales. En este sentido de nuevo un marcador de infiltración podría ser de utilidad en este contexto.

#### Cáncer de mama:

El cáncer de mama presenta la incidencia más alta y es la segunda causa de muertes por enfermedades neoplásicas entre las mujeres<sup>1</sup>. Aunque la mortalidad se ha reducido mucho en los últimos años, principalmente debido a una detección temprana<sup>77</sup> y a indudables avances en su tratamiento, el cáncer de mama sigue siendo un problema

social importante en los países desarrollados. Es por eso que se necesitan nuevos esfuerzos para realizar un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

El diagnóstico de los carcinomas ductales y lobulillares *in situ* y otras lesiones no invasivas en biopsias tomadas por aguja gruesa pueden presentar un desafío en el trabajo del patólogo. La existencia de grandes programas de cribado y la mejora de las técnicas radiológicas que permiten detectar lesiones de muy pequeño tamaño hacen que cada vez sea más frecuente el diagnóstico de carcinomas *in situ*. En este ámbito es donde la detección de lesiones incipientes de infiltración estromal se hace imprescindible. Este diagnóstico se basa actualmente en varios marcadores inmunohistoquímicos que detectan la ausencia de células basales así como cambios incipientes en el estroma peritumoral.

A pesar de lo expuesto previamente, en un metanálisis sobre una población con más de 7000 pacientes, se demuestra que más del 25% de biopsias pequeñas diagnosticadas como *in situ* presentaron infiltración en la biopsia postoperatoria<sup>78</sup>.

#### Cáncer de colon:

El adenocarcinoma colorrectal representa el tercero en frecuencia después del carcinoma pulmonar y prostático en el hombre y el mamario y pulmonar en la mujer<sup>1</sup>. Sin embargo, esta neoplasia es la segunda causa de muerte por cáncer después de los tumores pulmonares<sup>79</sup>. En la esfera del aparato digestivo, se trata de la neoproliferación que más muertes ocasiona, lo cual explica que sea un problema sanitario de primer orden.

Debido a la naturaleza de esta lesión, se pueden presentar múltiples lesiones benignas (pólipos) que dificultan la correcta catalogación de la malignidad cuando se trabaja con biopsias pequeñas obtenidas mediante colonoscopia. De nuevo las políticas sanitarias con la introducción de los programas de detección precoz del adenocarcinoma colorrectal han provocado una eclosión de diagnóstico de neoplasias de pequeño tamaño



y adenomas (pólipos) en los que pueden aparecer de manera incipiente fenómenos de infiltración del tallo con el riesgo de desarrollo de metástasis posterior.

En concreto, se antoja especialmente difícil el diagnóstico diferencial de la invasividad en lesiones cuando estas crecen dentro de un adenoma tubular o un adenoma vellosos<sup>80</sup>. Para el diagnóstico patológico, uno de las potenciales trampas o signos de interpretación engañosa es el de la pseudoinvasión del tallo producida por pliegues prominentes de la mucosa que en el momento del corte pueden simular glándulas incluidas en el tallo del pólipo. No existen técnicas auxiliares que puedan resultar de ayuda en este sentido aparte de la propia experiencia del patólogo que observa la lesión.

#### Cáncer renal:

El cáncer renal constituye en torno al 3% de todas las neoplasias malignas primarias del adulto, siendo la séptima neoplasia en frecuencia en varón y la décima en mujeres<sup>1</sup>. Sin embargo, es un tumor altamente agresivo y está considerado como el más letal de los tumores urológicos (por delante del adenocarcinoma prostático), con una mortalidad mayor del 30%.

El tratamiento quirúrgico de este tipo de neoplasia ha sufrido cambios y de hecho, la nefrectomía radical que era el procedimiento estándar hasta hace unos años se ha cambiado por la tumorectomía o incluso por nuevos sistemas como la termoablación. Para permitir dichos tratamientos es estrictamente necesario el disponer de un diagnóstico fiable previo que se alcanza con biopsias por aguja gruesa. Este cambio de paradigma diagnóstico provoca un cierto grado de incertidumbre diagnóstica como siempre que nos enfrentamos a una muestra muy limitada de tejido.

El diagnóstico diferencial del cáncer renal se antoja a menudo complicado cuando el tumor presenta patrones mixtos. Las limitaciones de estas biopsias se basan

principalmente en que a veces incluyen una cantidad mínima de tumor y que por tanto el muestreo es inadecuado, especialmente cuando se trata de tumores más grandes que pueden albergar células neoplásicas con diferentes características morfológicas. En concreto, existen un gran dilema diagnóstico cuando se observan focos de diferenciación sarcomatoide puesto que, dependiendo de la extensión, puede cambiar el manejo clínico posterior y el pronóstico de los pacientes<sup>81</sup>. En este caso, la propia biología del tumor puede darnos pistas diagnósticas al interrogar el estroma peritumoral<sup>82</sup>.

### Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es la cuarta causa de muerte por cáncer en América y Europa<sup>1</sup>. En sólo un tercio de los casos se diagnostica el cáncer de ovario en estadios locales, con una tasa de supervivencia después de 5 años de 60-70%, mientras que en la mayoría de los casos la enfermedad se diagnostica en estadio avanzado, con una supervivencia global a los 5 años de menos del 10%<sup>83</sup>.

La gradación histológica en el caso de los carcinomas ováricos es fundamental. Mucho más en el caso de las neoplasias quísticas donde se aprecia una estratificación que oscila entre los Cistoadenomas, Cistoadenocarcinomas y tumores de comportamiento incierto conocidos como Borderline. Los tumores ováricos borderline representan una entidad de enfermedad independiente entre los cánceres ováricos. Por sus características, el diagnóstico diferencial de este tipo tumoral es, generalmente, muy complicado<sup>84</sup> y se basa de nuevo en la identificación de áreas de infiltración del estroma. Dicho fenómeno es extraordinariamente difícil de identificar correctamente en este caso debido a las propias peculiaridades del estroma ovárico normal, mucho más celular que el de otros órganos.

Aunque se acepta que la resección quirúrgica completa del tumor es el mejor método curativo, no hay un protocolo definitivo, y existe un gran debate sobre el alcance que debe tener la cirugía y la necesidad de la preservación de la fertilidad en mujeres jóvenes.

### Cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga es una de las neoplasias más prevalentes, aunque es un tumor que no tiene una gran mortalidad, debido a su gran incidencia causa un gran número de muertes<sup>1</sup>. Esta es la razón por la cual debe realizarse un diagnóstico adecuado.

En la actualidad, la biopsia basada en la resección transuretral (RTU) proporciona la mejor herramienta para el diagnóstico de carcinoma de vejiga. Sin embargo, los problemas técnicos inherentes a dicha técnica de biopsia<sup>85</sup> hacen que, a veces, el diagnóstico sea inexacto, especialmente cuando hay falta de *muscularis propria* o presenta artefactos por fulguración. En este sentido, la diferenciación diagnóstica entre los casos que infiltran únicamente la lámina propia (pT1) y aquellos que infiltran el músculo detrusor de la vejiga (pT2) es crucial ya que marca el tratamiento clínico posterior<sup>86</sup>.

Por otro lado, es frecuente asimismo la presencia de áreas de carcinoma *in situ* en otras áreas de la mucosa vesical con lo que de nuevo adquiere importancia el diagnóstico diferencial de un carcinoma de células transicionales infiltrante de la lámina propia o un carcinoma *in situ* con un enfoque terapéutico diferente.

### Melanoma

Las lesiones tumorales cutáneas pigmentadas son entidades clínicas importantes tanto por su frecuencia como por su potencial maligno. Debido a la exposición a los rayos

ultravioletas, la incidencia de esta enfermedad está aumentando en los últimos años, y con ella la mortalidad asociada<sup>1</sup>.

El espesor del melanoma (índice de Breslow) sigue siendo el criterio histopatológico más importante para determinar el pronóstico del paciente<sup>87</sup>, aunque se ha demostrado que la presencia de ulceración, regresión, nivel elevado de Clark y un alto índice mitótico pueden ser factores pronósticos asimismo en este tipo de lesiones<sup>88</sup>. Sin embargo, la medición de estos índices (sobre todo el espesor) muchas veces se convierten en una ardua tarea para el patólogo, sobre todo cuando las biopsias no se han tomado correctamente o la lesión es muy pequeña<sup>88</sup>.

Por otro lado, la diferenciación entre cierto tipo de nevus como los displásicos o los nevus de Spitz por ejemplo puede ser extremadamente complicada y no existen técnicas auxiliares de ayuda en este contexto.



## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



## Hipótesis y Objetivos

Nuestra hipótesis, basada en la bibliografía sobre el tema, es que existe una expresión diferencial de COL11A1 en el estroma peritumoral de los tumores que han adquirido propiedades infiltrantes respecto a las lesiones neoplásicas no infiltrantes. Al existir la posibilidad de análisis de esta proteína mediante inmunohistoquímica rutinaria, podría convertirse en una técnica auxiliar de ayuda diagnóstica en la práctica diaria de un servicio asistencial de Anatomía Patológica.

Y para contrastar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos y desarrollos.

1. Identificación de las necesidades diagnósticas del servicio de Anatomía Patológica (al menos 5 modelos en los que el análisis de la infiltración tumoral puede generar conflicto diagnóstico no resuelto adecuadamente con las técnicas auxiliares ya existentes).
2. Recopilación de poblaciones representativas de cada una de estas necesidades con seguimiento posterior al diagnóstico.
3. Realización de análisis inmunohistoquímico frente a la proteína COL11A1 en cortes histológicos de cada paciente.
4. Determinación de los perfiles de sensibilidad y especificidad del COL11A1 como marcador de infiltración tumoral.





## ***MATERIAL Y MÉTODOS***



## Material y métodos

Tras una revisión bibliográfica y viendo los problemas más habituales que se presentan en el diagnóstico patológico de rutina, se seleccionaron, para este trabajo de tesis doctoral, distintas poblaciones muestrales con el fin de intentar estudiar la implicación del COL11A1 en el diagnóstico diferencial.

Algunas poblaciones (mama, colon y riñón) son más grandes (y con información de cada paciente) ya que pertenecen a otros proyectos que se llevan a cabo en nuestro grupo de investigación. Las poblaciones más pequeñas se reclutaron en exclusiva para la realización de este proyecto de tesis.

Todas las muestras utilizadas para el desarrollo de esta tesis doctoral se han diagnosticado y seleccionado del banco de tumores del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander.

## Cáncer de Mama

Se seleccionaron 201 pacientes con evidencia radiológica de lesión mamaria. Con el fin de que este estudio tuviese aplicabilidad clínica se seleccionaron muestra obtenidas mediante punción-aspiración por aguja gruesa, ya que es en este material donde más problemas surgen en la determinación de la invasividad tumoral, al haber muy poco tejido.

El diagnóstico posterior resultó en 87 carcinomas ductales infiltrantes, 14 carcinomas lobulillares infiltrantes y 4 carcinomas infiltrantes de otros subtipos. En cuanto a las lesiones tumorales no infiltrantes se obtuvieron 19 carcinomas ductales *in situ*, 6 carcinomas lobulillares *in situ*, 30 adenomas y 17 hiperplasias epiteliales. Además, se reclutaron 24 lesiones no tumorales (fibrosis, calcificaciones ductales, cicatrices radiales...). De todas estas muestras se tuvo un seguimiento mínimo de 4 años.

Con vistas a validar la aplicación médica del colágeno se seleccionó una segunda población compuesta únicamente por 40 carcinomas *in situ* que habían presentado dificultades diagnósticas considerables en el diagnóstico en biopsia de aguja. De todas ellas, 21 muestras presentaron infiltración en la resección quirúrgica posterior.

## Cáncer de Colon

Al igual que en la mama, en el cáncer de colon seguimos un enfoque doble, por un lado se realizó el estudio de expresión en muestras puras de carcinomas invasivos (30) y se comparó con lesiones tumorales no invasivos (pólipos) o lesiones no tumorales (21).

Posteriormente se buscaron casos complejos en cuanto a su diagnóstico, así se determinó el perfil de expresión de COL11A1 en 23 carcinomas *in situ* asentados sobre adenomas tubulares, de los cuales 13 presentaron infiltración tumoral en cirugías

posteriores. Estas últimas muestras fueron obtenidas mediante colonoscopia, con el fin de determinar la validez clínica del marcador en las condiciones más complicadas de diagnóstico.

### Cáncer de Riñón

Para el desarrollo de este apartado se seleccionaron un total de 142 pacientes intervenidos quirúrgicamente por sospecha de cáncer renal en el Servicio de Urología del Hospital Marqués de Valdecilla, con un seguimiento mínimo de 9 años.

En concreto se recopilaron datos sobre 95 carcinomas convencionales, 15 carcinomas con diferenciación sarcomatoide, 13 oncocitomas, 7 carcinomas cromófbos y 22 carcinomas papilares.

### Cáncer de Vejiga:

Al igual que en la mama y en el colon, para determinar la importancia del uso clínico del COL11A1 en carcinomas de vejigas, se utilizaron muestras obtenidas mediante resección transuretral, ya que, a veces, presentan problemas diagnósticos por su pequeños tamaño o por los artefactos que se generan por quemaduras eléctricas del tejido.

Se seleccionaron un total de 43 muestras distribuidas de la siguiente manera; 11 pTa, 15 pT1, 11 pT2 y 6 lesiones no tumorales.

### Melanoma

Para este apartado se han estudiado 10 casos de Nevus y 10 casos de melanomas, con el fin de determinar una posible expresión diferencial de dicho marcador.

### Cáncer de Ovario

Para determinar el potencial del COL11A1 en la detección de la infiltración en cáncer de ovario se comparó la expresión del marcador en un total de 27 carcinomas infiltrantes (3 endometrioides, 3 mixtos, 4 mucinosos, 14 papilares y 3 metástasis colónicas) respecto a 5 lesiones benignos.

### Cáncer de Pulmón

A la hora de examinar los tumores pulmonares nos planteamos dos enfoques, para una primera aproximación, se seleccionaron 10 adenocarcinomas, 10 carcinomas epidermoides y 5 lesiones no malignas (fibrosis). En cuanto al segundo estudio se seleccionaron 5 mesoteliomas malignos difusos y 5 hiperplasias mesoteliales.

### Técnicas Inmunohistoquímicas

Para el estudio de la expresión del COL11A1 se realizaron cortes de 3  $\mu$ m a partir de los bloques seleccionados y se colocaron sobre portaobjetos Superfrost™ Plus para inmunohistoquímica (Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts).

La determinación del COL11A1 se realizó mediante una técnica inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal anti proCol11a1 (clon 1E8.33, Oncomatrix, Bilbao, ESPAÑA). Para la visualización se utilizó el sistema automatizado Benchmark Ultra (Roche-Ventana, Oro Valley, Arizona, EE.UU.). Para la recuperación antigénica se utilizó tampón Ultra CC2 durante 16 minutos a 98°C. El anticuerpo se diluyó a 25  $\mu$ g/ml y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Para la visualización se empleó el Optiview Kit (Roche-Ventana) según el protocolo del fabricante.

Para el análisis de las células mioepiteliales en cáncer de mama, las muestras se pretrataron durante 20 min a 98°C en Target Retrieval Solution, High pH (K8004, Dako). Posteriormente, se incubaron los anticuerpos primarios contra Calponina (Calp M3556, Dako) y p63 (DAK-p63 clon IR662, Dako) a temperatura ambiente durante 1 hora. El revelado de la inmunohistoquímica se realizó con el kit EnVision DuoFLEX Doublestain System (SK110, K6807DAKO) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Por último, los tejidos se deshidrataron con alcohol etílico de gradación creciente (96% y absoluto), se lavaron en xilol y se montaron sobre DPX (Dibutilftalato en xileno, BPH, Poole, England).

La cuantificación de las células mioepiteliales se llevó a cabo según las guías publicadas dándose como positiva cuando se perdía la continuidad lineal de las células alrededor de los conductos o acinos.

En el caso del COL11A1 la simple presencia de inmunomarcaje fue relacionada con expresión positiva y, en consecuencia, considerado como criterio de invasividad tumoral; ya que es un marcador que sólo se expresaría en los fibroblastos dispersos en el estroma tumoral y su sensibilidad/especificidad es suficientemente alta como para discriminar una lesión infiltrante. Por tanto, este biomarcador fue cuantificado de forma dicotómica como positivo o negativo, considerando la muestra como positiva con la tinción de al menos un fibroblasto.

### Estadística

Para gestionar todos los parámetros clínicos e histopatológicos se generó una tabla utilizando el programa Microsoft Excel 2013.



El estudio estadístico ha sido llevado a cabo utilizando los paquetes estadísticos SPSS versión 20 y GraphPad Prism versión 6.01.

El análisis de la expresión diferencial del COL11A1, se ha realizado mediante un test de Chi Cuadrado con corrección de Fisher. En todos los casos se consideró una  $p < 0,05$  como significativa.

El análisis de supervivencia, fue llevado a cabo mediante curvas de Kaplan-Meier y comparativas de LogRank.

## ***RESULTADOS***



## Resultados

A continuación pasamos a resumir los principales hallazgos encontrados en este trabajo de tesis doctoral.

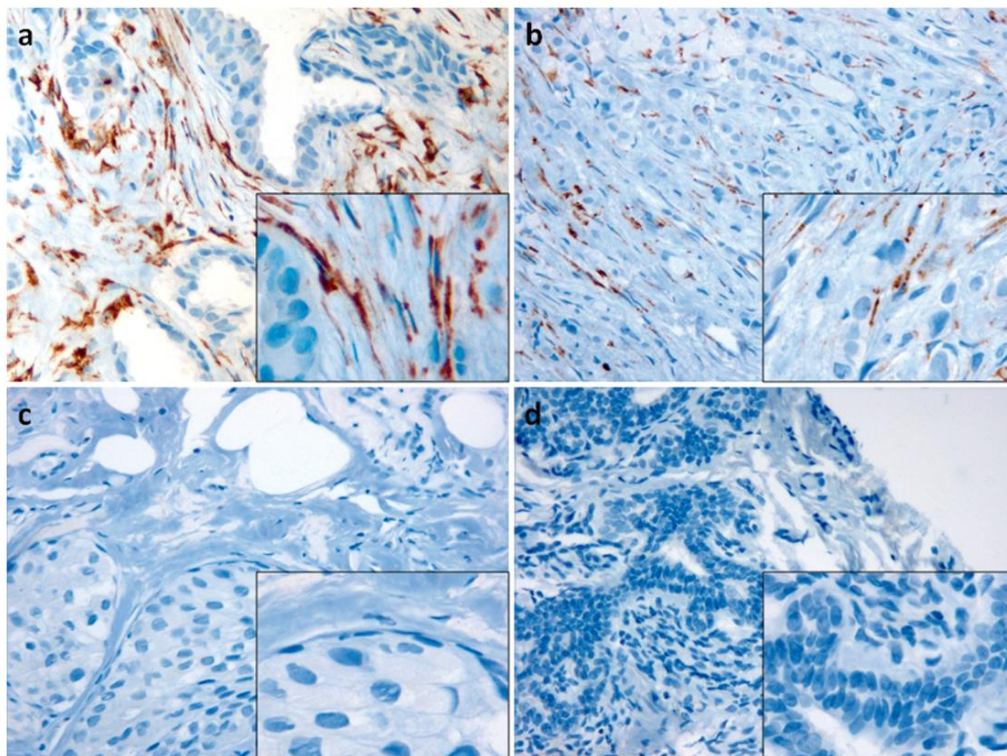
Como se ha mencionado anteriormente en material y métodos, existen dos tipos de poblaciones, aquellas utilizadas anteriormente por el grupo de investigación y de las que se tienen datos clínicos relevantes y otras más pequeñas que se reclutaron únicamente para validar la utilidad clínica en el diagnóstico.

## Cáncer Mama

La edad media de los pacientes fue de 56, con un rango de 47 años para el percentil 25 y hasta 67 años en percentil 75. El 53% de las lesiones fueron diagnosticadas en la mama izquierda, mientras que el 47% se detectó en el seno derecho.

Al ser un marcaje de la matriz extracelular, la expresión de pro-COL11A1, se observó en grupos de fibroblastos asociados a tumor. Concretamente, se vio una mayor acumulación del marcaje en áreas de expansión tumoral, aunque también expresaban los fibroblastos de alrededor de los nidos tumorales más compactos. Se consideró como positiva cualquier muestra que presentara al menos un fibroblasto teñido, ya que como se ha discutido ampliamente en la introducción, la expresión de este marcador por el estroma tumoral es un evento específico de la invasividad tumoral.

Entre los carcinomas infiltrantes el 94% presentaron tinción positiva (Figura 6 a, b), mientras que las lesiones no invasivas presentaron sólo un 3% de inmunomarcaje ( $p<0,0001$ ) (Figura 1c, d).



**Figura 6: Expresión de COL11A1 in lesiones mamarias.**

Inmunotinción para pro-COL11A1 en a) carcinoma ductal infiltrante, b) carcinoma lobulillar infiltrante, c) carcinoma ductal *in situ* y, d) lesión no neoplásica. Contraste Hematoxilina.

Aumentos originales 300X, cuadros 600X.

En la tabla 1 se presentan las características de expresión para cada subtipo histológico. Cabe destacar, de estos datos, que 6 muestras que fueron diagnosticadas como lesiones *in situ* en biopsias de aguja gruesa, presentaron inmunomarcaje para pro-COL11A1. La biopsia quirúrgica complementaria, no obstante fue diagnosticada de lesión invasiva. Los tres casos falsos positivos (dos carcinomas ductales *in situ* y una lesión no tumoral) no han mostrado ningún tipo de recurrencia con un seguimiento de cinco años.

**Tabla 1: Inmunomarcaje para COL11A1 por lesión**

|                                            | Tinción para COL11A1 |          |
|--------------------------------------------|----------------------|----------|
|                                            | Positiva             | Negativa |
| <b>Carcinoma ductal infiltrante</b>        | 82                   | 5        |
| <b>Carcinoma lobulillar infiltrante</b>    | 12                   | 2        |
| <b>Otros carcinomas invasivos</b>          | 4                    | 0        |
| <b>Carcinoma ductal <i>In situ</i></b>     | 2                    | 17       |
| <b>Carcinoma lobulillar <i>In situ</i></b> | 0                    | 6        |
| <b>Fibroadenoma</b>                        | 0                    | 30       |
| <b>Hiperplasia columnar</b>                | 0                    | 17       |
| <b>Lesión no tumoral</b>                   | 1                    | 23       |

De estos datos se desprende que la inmunotinción del pro-COL11A1 muestra una sensibilidad del 94% y una especificidad del 97% cuando se utiliza como marcador de infiltración en los tumores de mama. Además, la expresión de pro-COL11A1 en lesiones de mama tiene un likelihood ratio de 14, un valor predictivo positivo de 0,97, y un valor predictivo negativo de 0,93.

Con el fin de determinar la utilidad clínica real de este marcador, decidimos comparar este marcador con el marcaje convencional de infiltración en la rutina clínica del diagnóstico de cáncer de mama. Para ello se reclutaron 40 muestras, obtenidas mediante punción de aguja gruesa, que habían presentado dificultades en su diagnóstico anatomopatológico y sobre las que se había recurrido a pedir marcadores de infiltración (células mioepiteliales). Por tanto se realizaron cortes seriados y se tiñeron para Calponina, p63 y pro-COL11A1.

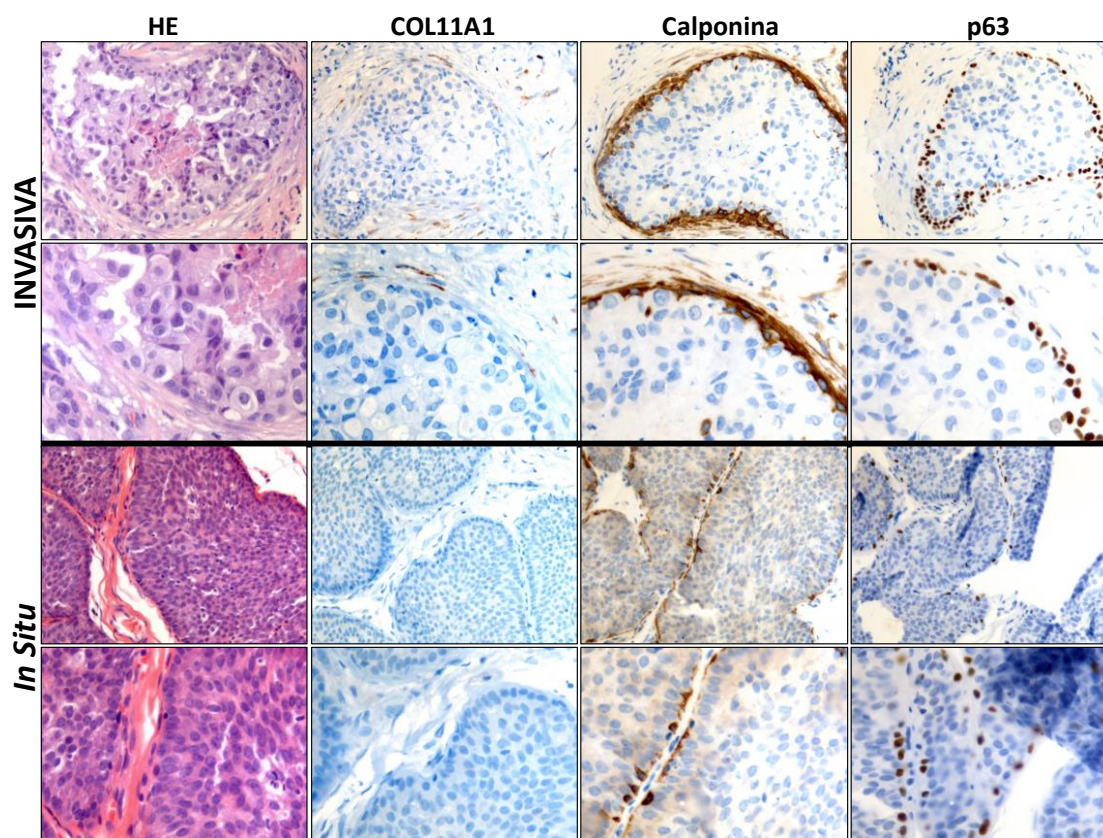
Aunque las 40 muestras fueron diagnosticadas como carcinomas *in situ* mediante el estudio de los marcadores tradicionales (calponina y p63), 21 de ellas presentaron microinfiltración en la biopsia quirúrgica posterior (para este apartado se seleccionaron *ex proceso* muestra infradiagnosticadas de los últimos años) (Tabla 2).

*Tabla 2: Marcadores de células mioepiteliales y pro-COL11A1*

|                       | Calponina |          | p63       |          | COL11A1   |           |
|-----------------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|
|                       | Positivo  | Negativo | Positivo  | Negativo | Positivo  | Negativo  |
| <b>No infiltrante</b> | <b>19</b> | <b>0</b> | <b>19</b> | <b>0</b> | <b>2</b>  | <b>17</b> |
| <b>Infiltrantes</b>   | <b>20</b> | <b>1</b> | <b>19</b> | <b>2</b> | <b>19</b> | <b>2</b>  |

A diferencia de los marcadores de células mioepiteliales, la expresión del COL11A1 pudo identificar la microinvasión, incluso en ausencia de zonas infiltrante en la muestra. Diecinueve de las 21 muestras que resultaron invasivas en la biopsia quirúrgica fueron inmunopositivas para COL11A1, mientras que sólo 2 de las lesiones *in situ* puras presentaron expresión (Figura 7).





**Figura 7: Comparativa de expresión entre lesiones In situ diagnosticadas en cilindro de aguja gruesa.**

Se presenta cortes seriados de dos muestras con diagnóstico inicial de lesión in situ. Mientras que la aparición del COL11A1 significa infiltración, los marcadores de células mioepiteliales son al contrario, y para que se de infiltración deben desaparecer. Estos marcadores son de carácter negativo, es decir se encuentran presentes en lesiones in situ y no infiltrantes. Arriba, lesión con posterior diagnóstico de invasividad, abajo in situ puro.

La expresión del pro-COL11A1 presenta, por tanto, una capacidad para determinar la microinfiltración significativamente mayor ( $p < 0,0001$ ) que la calponina o p63, con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 89% (tabla 3).

**Tabla 3: Estadísticos de los distintos marcadores de invasividad en biopsias de mama complejas**

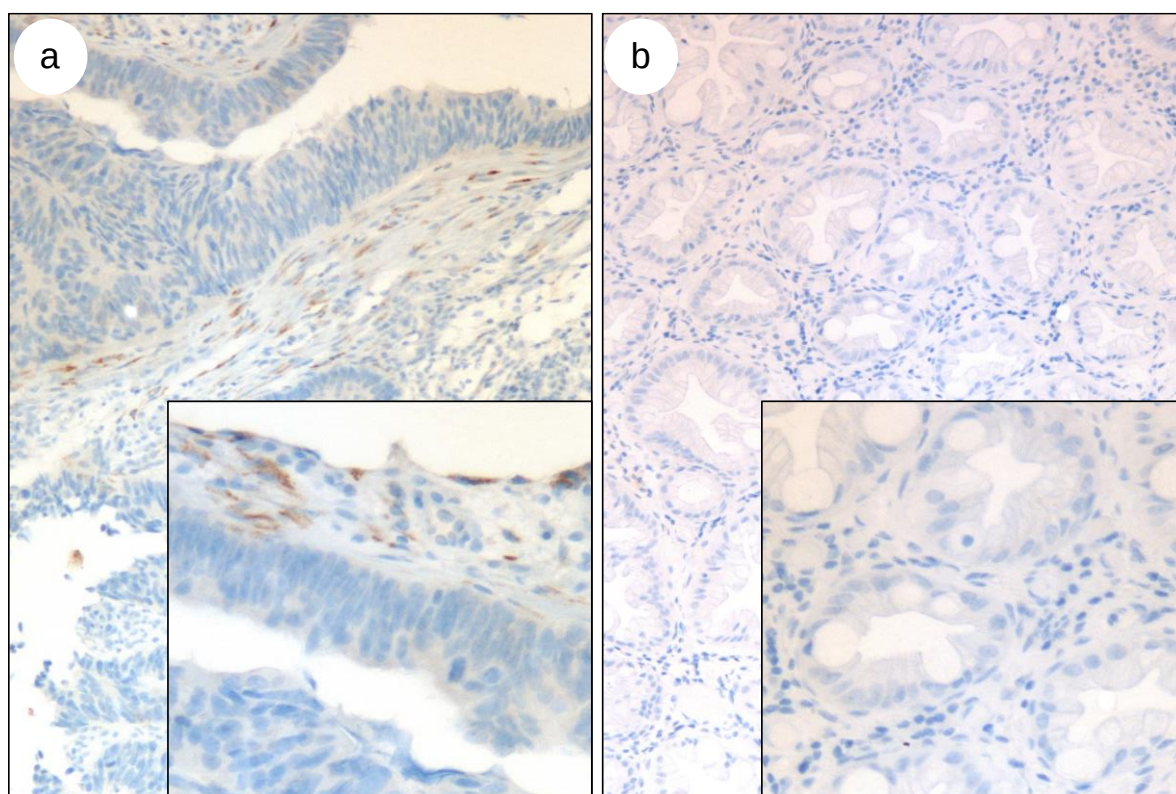
|                                  | Calponina | p63   | COL11A1 |
|----------------------------------|-----------|-------|---------|
| <b>Sensibilidad</b>              | 4.8%      | 9.5 % | 90%     |
| <b>Especificidad</b>             | 100%      | 100%  | 89%     |
| <b>Valor predictivo positivo</b> | 1         | 1     | 0.90    |
| <b>Valor predictivo negativo</b> | 0.49      | 0.5   | 0.89    |



### Cáncer Colon:

Al igual que en el cáncer de mama, la idea de este trabajo en colon es ver la utilidad diagnóstica del COL11A1 en las muestras más complejas del devenir patológico diario.

Se empezó comparando dicho marcador en muestras infiltrantes y muestras no infiltrantes, con el fin de determinar si en las condiciones más fáciles se podía distinguir un patrón de expresión diferencial. De los 30 adenocarcinomas infiltrantes, 29 presentaron inmunomarcaje para el COL11A1, mientras que ninguna de las 21 muestras no invasivas presentó expresión positiva ( $p < 0,0001$ ). Al igual que en los tumores de mama, se observó tinción en los fibroblastos asociados a las células tumorales (Figura 8).



**Figura 8: Expresión de COL11A1 en colon.**

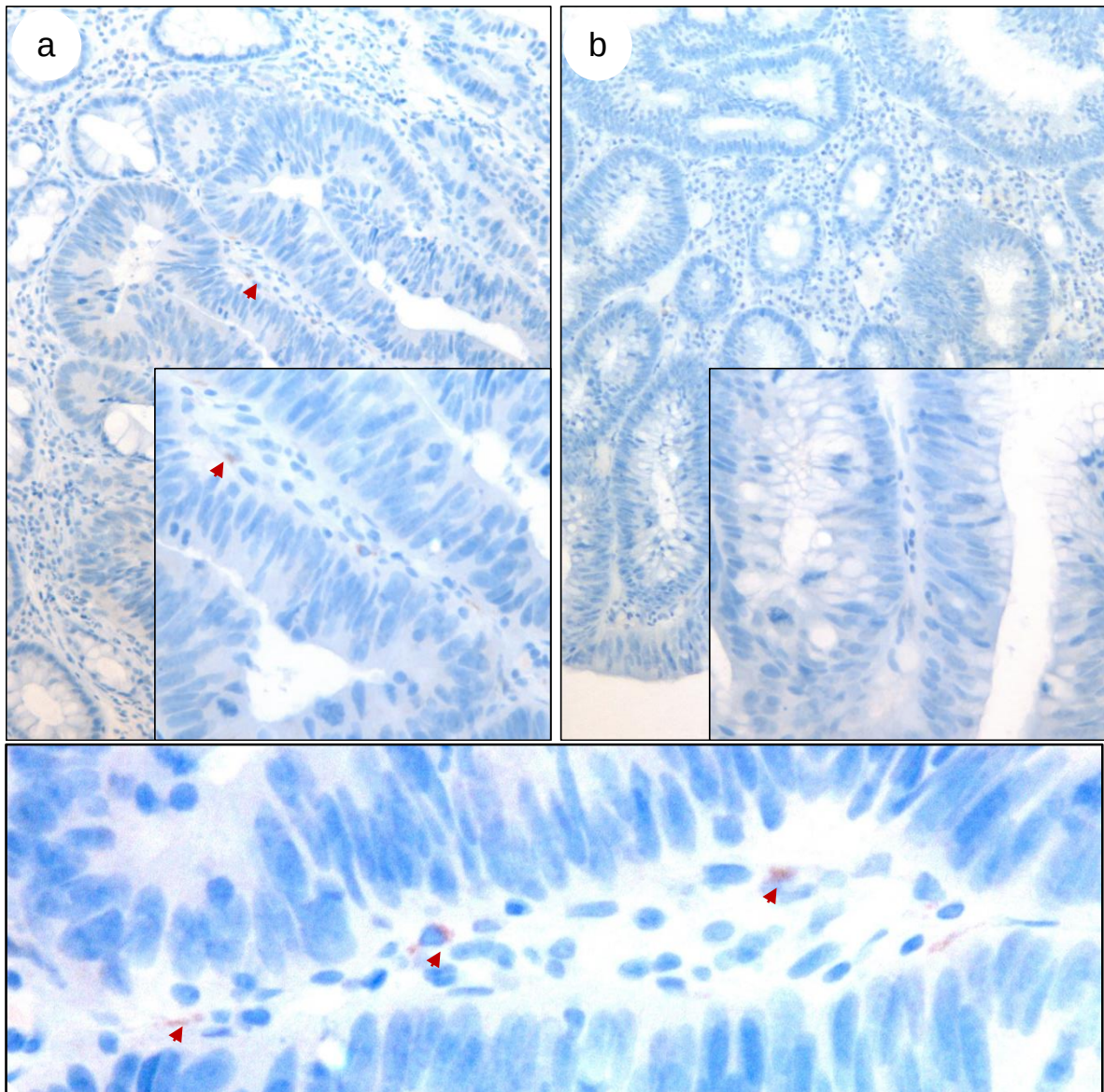
*a) Carcinoma infiltrante de colon, b) pólipo colónico. Contraste con hematoxilina. Aumento original x180, Recuadro x360*

De estos datos se desprende la capacidad como marcador de infiltración en tumores de colon del COL11A1, con una sensibilidad del 97% y una especificidad del

100%. No obstante, aunque estos datos son tremendamente buenos, no dejan de ser una aproximación teórica sin una validación clínica conveniente.

Para ello, se determinó hacer un estudio de validez del COL11a1 en una de las lesiones que más problemas diagnósticos causa en el estudio de los tumores de origen colorectal (en biopsias obtenidas por colonoscopia), los carcinomas *in situ* asentados sobre pólipos adenomatosos, y más concretamente su posible microinfiltración. Para ello se seleccionaron 23 de dichas lesiones con y sin infiltración en la cirugía posterior.

De las 13 lesiones que presentaron una infiltración en la biopsia quirúrgica posterior, 7 fueron inmunopositivos para la expresión del COL11A1, mientras que ninguno de los *in situ* puros presentó expresión ( $p=0,0027$ ). Se observó un pequeño marcaje en los nidos fibroblásticos que rodeaban el tumor y, al igual que en los anteriores apartados, se consideró positiva cualquier muestra con al menos un fibroblasto marcado (Figura 9).



**Figura 9: Expresión de COL11A1 en carcinoma “in situ” asentado en pólipo adenomatoso de colon.**  
a) Carcinoma con posterior infiltración, b) Carcinoma in situ puro. Nótese la tinción marcada con flechas rojas en la imagen inferior. Contraste con hematoxilina. Aumento original x180, Recuadro x360

### Cáncer Renal

A diferencia de las anteriores aproximaciones diagnósticas del COL11A1, y por experimentos previos realizados por nuestro grupo, en el caso del carcinoma renal planteamos la posibilidad de que la expresión de este marcador fuera un marcador diferencial del subtipo tumoral ya que, a veces, se pueden plantear dificultades diagnósticas.

La población reclutada presentó una desviación significativa ( $p<0,001$ ) en cuanto a su distribución por sexos, siendo superior en varones (68,59%) que en mujeres. En cuanto a la edad en el momento del diagnóstico, la media de la población fue de 62,13 años, con un rango de 51 a 70 años. Al separarlos por subtipos tumorales, se ve un aumento significativo ( $p<0,05$ ) en la franja comprendida entre 51 y 60 años para las morfologías de carcinoma cromóforo y oncocitoma (Tabla 4)

*Tabla 4. Porcentaje de rango de edad por subtipo tumoral.*

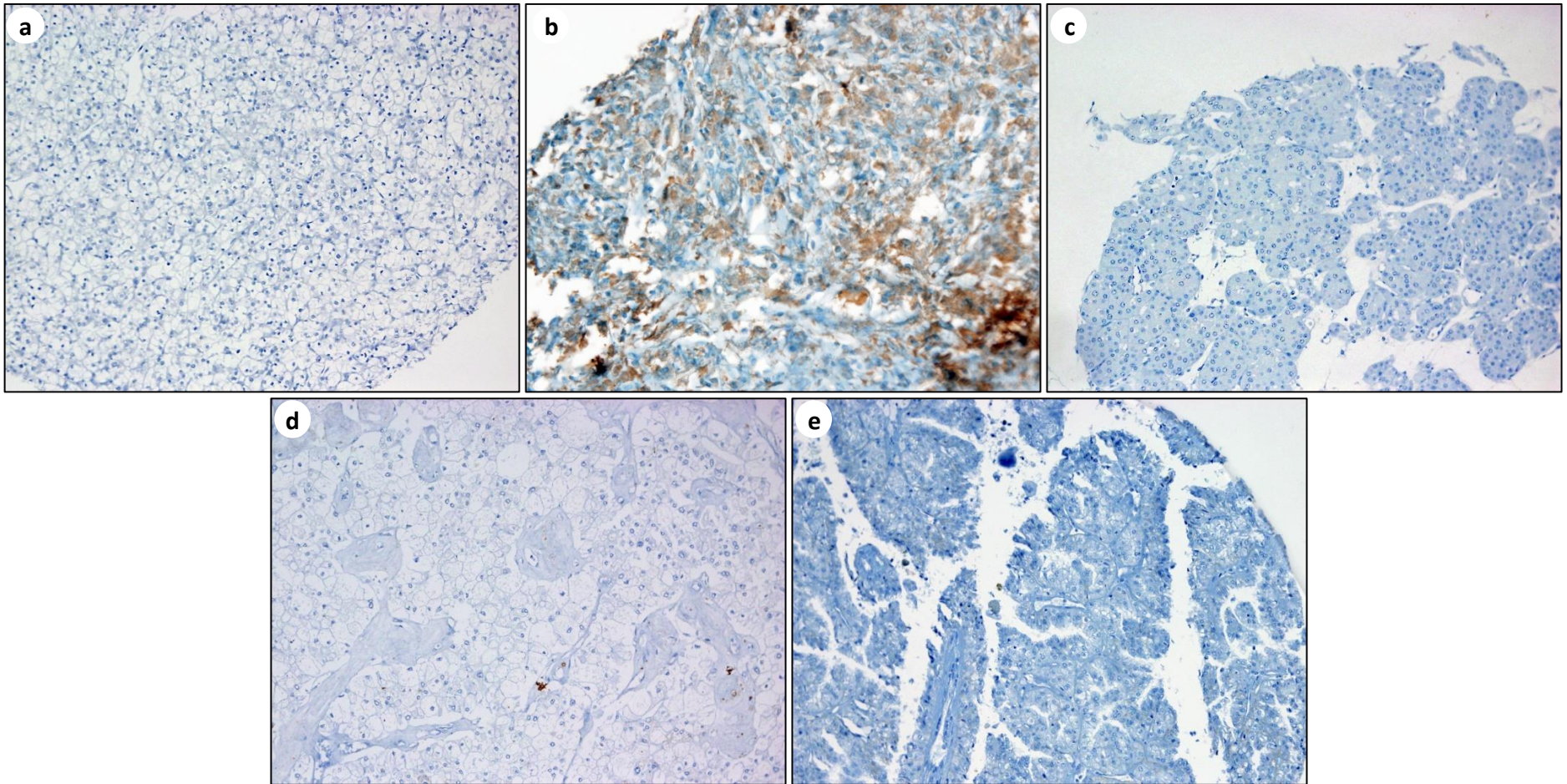
|                   | Convencional | Sarcomatoide | Oncocitoma | Cromóforo | Papilar |
|-------------------|--------------|--------------|------------|-----------|---------|
| <b>0-30 años</b>  | 1,05%        | 0%           | 0%         | 0%        | 4,54%   |
| <b>31-50 años</b> | 16,84%       | 17,65%       | 6,67%      | 14,28%    | 13,64%  |
| <b>51-60 años</b> | 22,10%       | 23,53%       | 46,67%     | 42,86%    | 18,18%  |
| <b>61-70 años</b> | 31,58%       | 29,41%       | 26,67%     | 28,57%    | 27,27%  |
| <b>71-80 años</b> | 27,38%       | 29,41%       | 13,33%     | 14,28%    | 22,73%  |
| <b>81-90 años</b> | 1,05%        | 0%           | 6,67%      | 0%        | 13,64%  |

A diferencia de otros tejidos, en los que se vio una intensa tinción en el estroma circundante a los tumores infiltrantes, los carcinomas renales apenas mostraron tinción fibroblástica (Tabla 5). No obstante, se observó una tinción positiva en las células tumorales de los carcinomas con diferenciación sarcomatoide. De hecho, el 73,3% de estos tumores presentaron inmunomarcaje, mientras que para el resto de los subtipos histológicos no se observó tinción alguna en las células tumorales (Figura 10).

*Tabla 5. Número de casos por subtipo tumoral para la expresión de COL11A1.*

|                     | Col Positivo | Col Negativo | Porcentaje | No Válidos |
|---------------------|--------------|--------------|------------|------------|
| <b>Convencional</b> | 15           | 70           | 17,4%      | 10         |
| <b>Sarcomatoide</b> | 11           | 4            | 73,3%      | 2          |
| <b>Oncocitoma</b>   | 1            | 12           | 7,6%       | 2          |
| <b>Cromóforo</b>    | 0            | 7            | 0%         | 0          |
| <b>Papilar</b>      | 4            | 18           | 18,2%      | 0          |





**Figura 10. Inmunotinción para COL11A1.**  
Carcinomas a) Convencional, b) Sarcomatoide, c) Oncocitoma, d) Cromófobo y e) Papilar. Aumento original x180

Estos datos demuestran un tinción diferencial significativa ( $p<0,0001$ ) al comparar el fenotipo sarcomatoide contra el resto, pudiendo ser de ayuda en el diagnóstico de esta variedad tumoral que, a veces, se encuentra en combinación con otras histologías.

Como disponíamos de los datos de seguimiento de los pacientes, decidimos investigar si la expresión del COL11A1 podía relacionarse con la malignidad tumoral. Para ello se realizó un análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier. Los resultados demuestran que la expresión de COL11A1 en el tumor, se asocia significativamente ( $p<0,001$ ) con descenso en la supervivencia independientemente del subtipo histológico (Figura 11). Este hallazgo sugiere que la expresión del COL11A1 podría servir como marcador pronóstico, y deberían, por tanto realizarse más estudios al respecto.

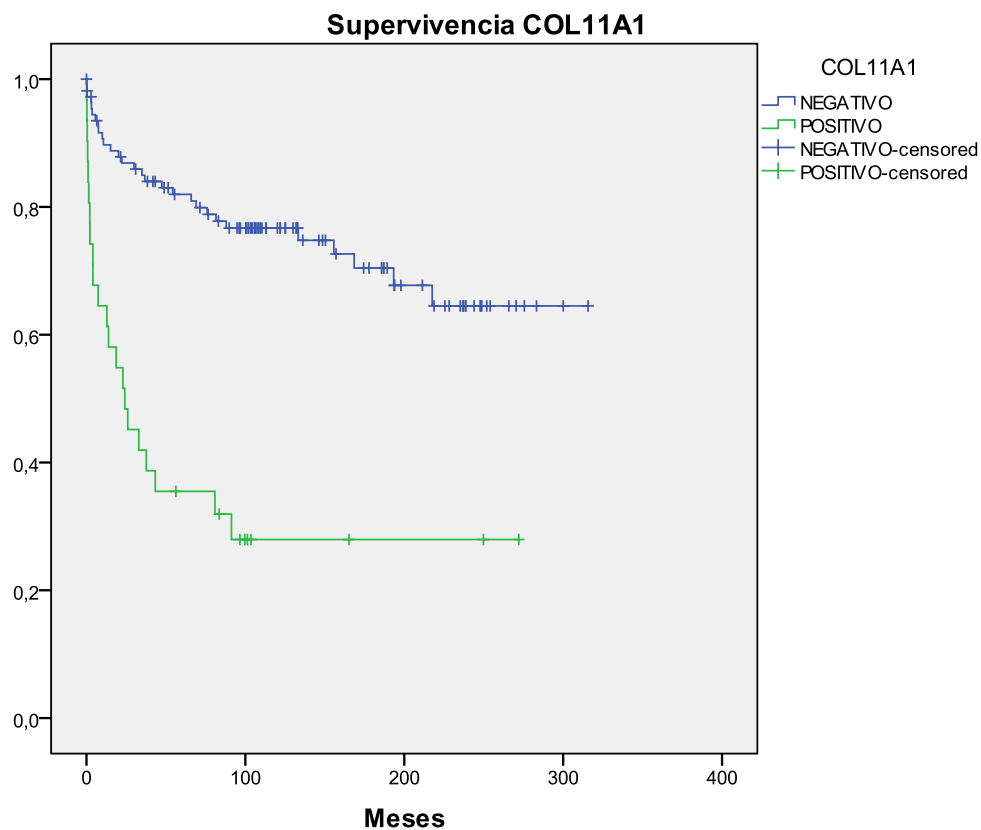
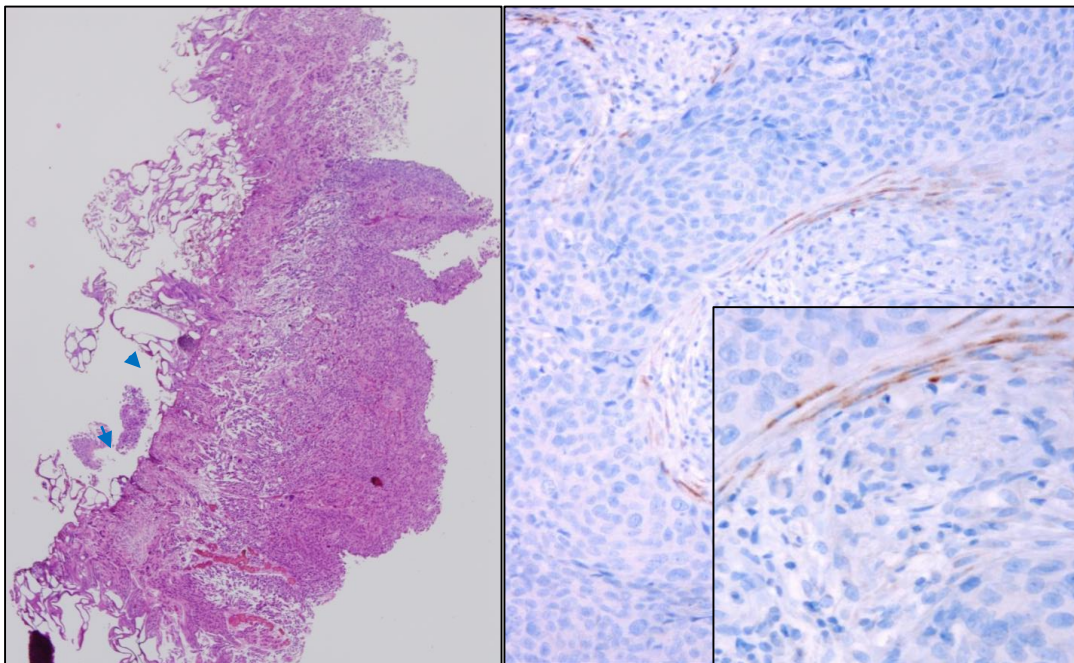


Figura 11. Supervivencia en meses por expresión de COL11A1

## Cáncer Vejiga

El estudio de esta variedad tumoral surgió por petición expresa de una Médico Adjunto del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, ya que en un principio no se había considerado para su análisis.

Se nos presenta una mujer con un carcinoma de células transicionales de vejiga urinaria que invadía conectivo subepitelial pero sin llegar a verse en el musculo detrusor por lo que se diagnostica como pT1 (en biopsia obtenida por resección transuretral). Dos años después, se remite por infiltración de alto grado en cérvix uterina y metástasis supraclavicular de ganglios linfáticos. Tras la revisión del primer diagnóstico se observan zonas de artefacto por quemaduras eléctricas en el músculo, por lo que se nos pide realizar el estudio de expresión de COL11A1. El resultado para dicha biopsia fue positivo (Figura 12), por lo que la actitud terapéutica debería haber sido más agresiva en este caso.

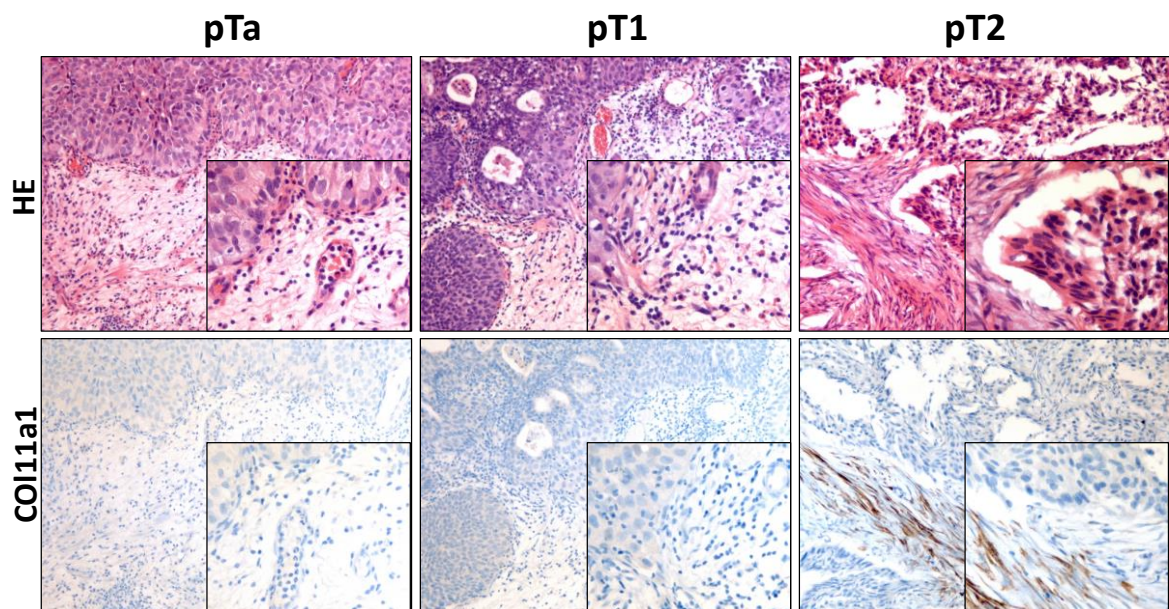


**Figura 12:** Inmunotinción para COL11A1 en biopsia transuretral de vejiga urinaria. Obsérvese en la HE los artefacto por quemadura eléctrica (flecha).



Viendo este resultado se decidió realizar un estudio comparativo entre muestras de carcinoma de células transicionales de vejiga con comportamiento benigno (no tumorales, pTa y pT1) y lesiones con comportamiento maligno (pT2).

Del total de tumores con estadio pT2, un 91% (10 de 11) presentó inmunomarcaje positivo, mientras que sólo 31 de las 32 muestras no infiltrantes de la muscular propia resultaron negativas para la expresión del marcador. Al igual que en otros tejidos como en mama o colon, se observó un fuerte tinción citoplasmática para los fibroblastos asociados a tumor de las muestras pT2 (Figura 13).



**Figura 13: Inmunotinción para COL11A1 en biopsia transuretral de vejiga urinaria.**

*Se observa inmunotinción en la muestra diagnosticada como pT2, mientras que ninguna de las pTa o pT1 presenta expresión del marcador. Contraste de las inmunohistoquímicas con hematoxilina.*

*Aumento original x180, Recuadro x360.*

Estos resultados muestran una expresión diferencial significativa ( $p < 0,001$ ) entre las biopsias diagnosticadas como pT2 y aquellas que no presentan invasión en la muscular propia, con una sensibilidad y especificidad mayores del 90%.

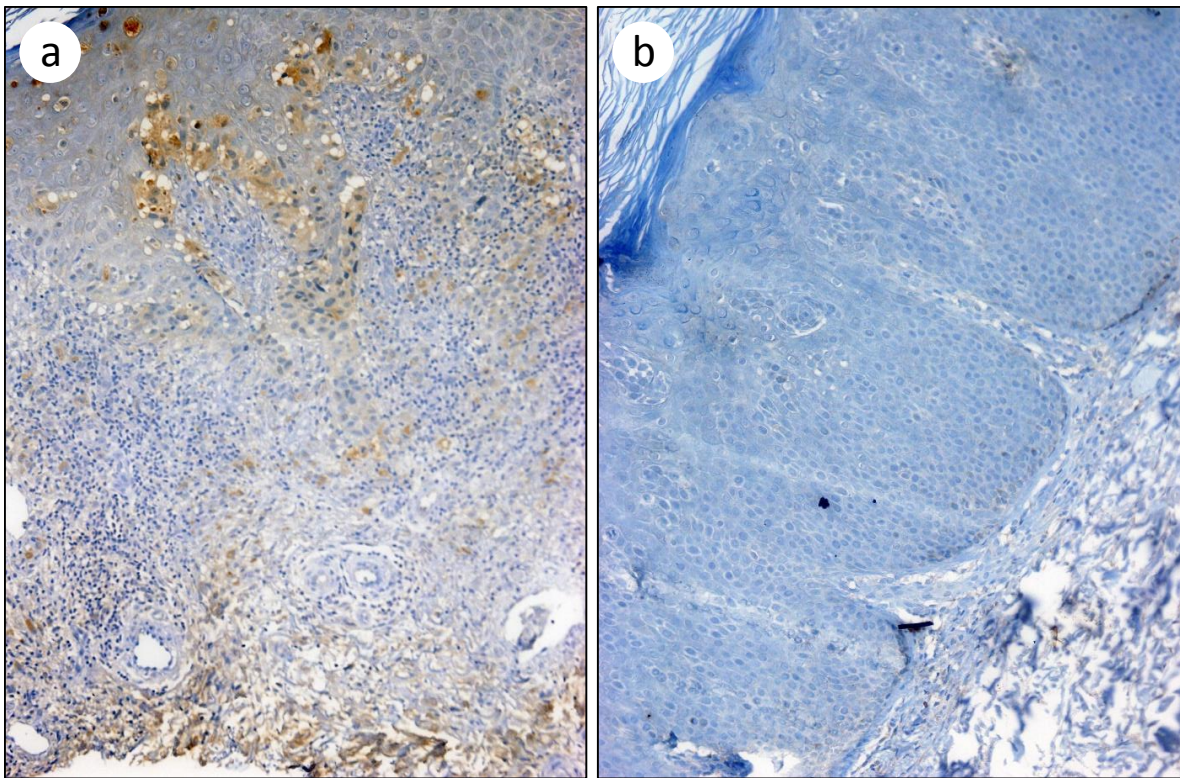


## Melanoma

La idea de este apartado surge de los problemas diagnósticos a los que se enfrenta el patólogo cuando se encuentra con Nevus atípicos y de Spitz, en los que a veces resulta complicado ver si hay o no invasidad.

En este caso, ninguno de los Nevus analizados presentó expresión de COL11A1. De igual modo, no se observó inmunomarcaje en ninguno de los melanomas estudiados. La gran concentración de pigmento que posee esta lesión complicó el análisis de esta técnica, no obstante no se observó presencia alguna de fibroblastos (Figura 14).

En este caso, por tanto, parece que la tinción con COL11A1 no aporta una herramienta diagnóstica efectiva para el devenir diario del patólogo



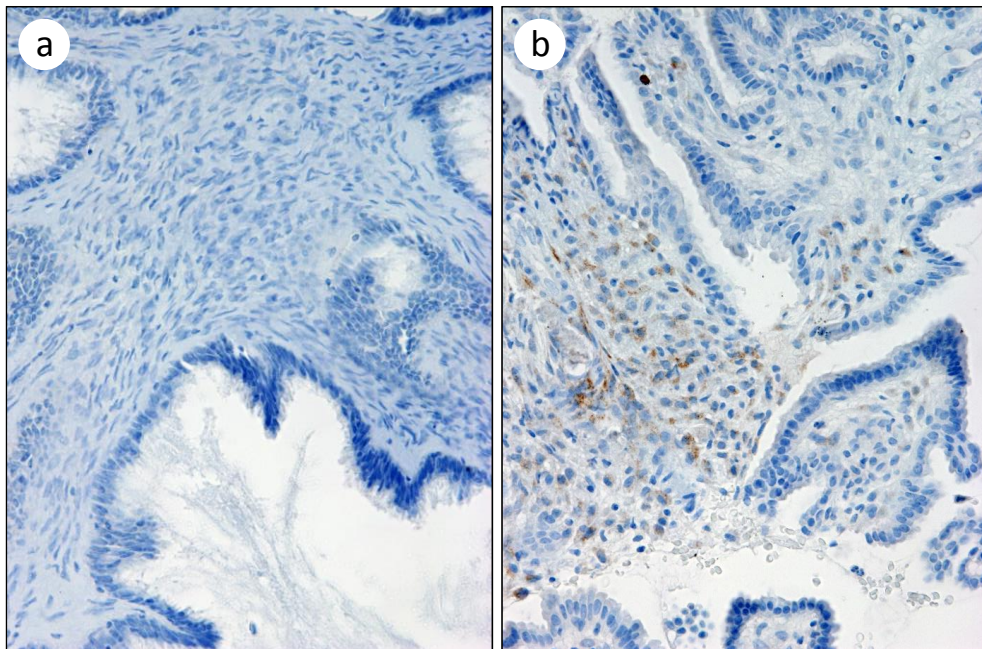
**Figura 14: Inmunomarcaje para COL11A1 en lesiones de piel.**  
a) Melanoma y b) nevus melanocítico. Contrastadas con Hematoxilina. Aumento original 200X.

### Cáncer de Ovario

Se seleccionó esta localización tumoral con la idea de determinar la utilidad clínica del COL11A1 para predecir la invasividad en carcinomas borderline de ovario, que puede causar dificultades para su diagnóstico certero.

Tal y como se realizó en mama y en colon, en primer lugar se realizó una selección de tumores infiltrantes conocidos y se compararon, a nivel de expresión del COL11A1, con muestras no tumorales con el fin de determinar el grado de sensibilidad de la técnica.

Del total de las lesiones invasivas, 20 presentaron expresión de COL11A1 medido por inmunohistoquímica, mientras que ninguna de las 5 lesiones no tumorales presentó inmunomarcaje (Figura 15). Aunque la expresión diferencial entre lesiones infiltrantes y no infiltrantes resultó significativa ( $p=0,039$ ), tanto la sensibilidad (74%) como, principalmente, el valor predictivo negativo (0,41) no fueron lo suficientemente adecuados para validar la técnica en determinaciones más complejas.



**Figura 15: Inmunomarcaje para COL11A1 carcinomas de ovario.**

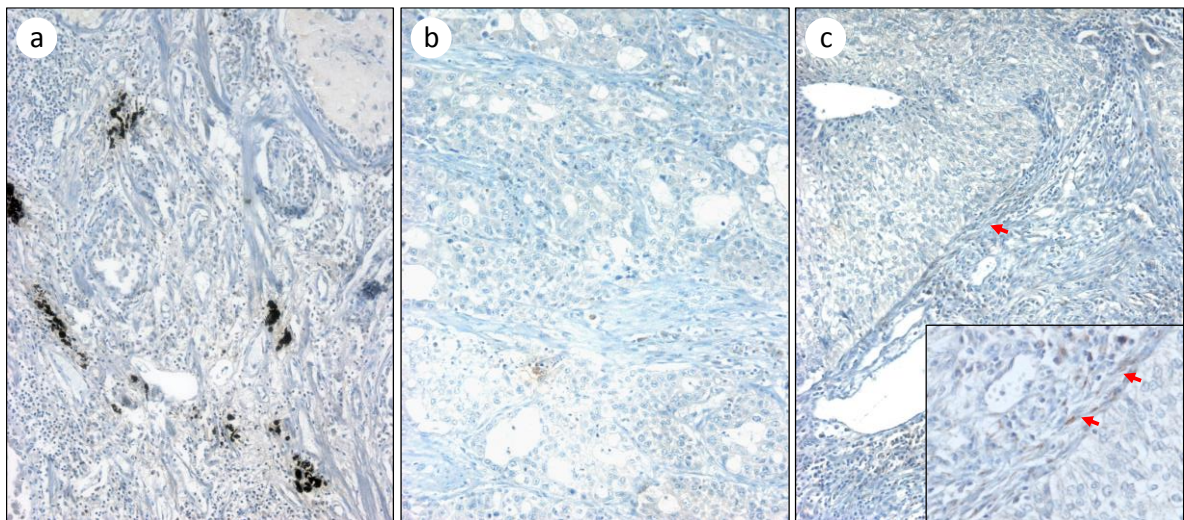
*a) Cistoadenocarcinoma mucinoso de ovario negativo, b) Carcinoma papilar seroso de ovario positivo*



## Cáncer de Pulmón

A la hora de diagnosticar los tumores pulmonares se plantean dos grandes focos de problemas. En primer lugar, y al igual que otros tipos tumorales, saber diferenciar los casos de microinvasión de aquellos tumores puramente *in situ*. En un segundo grupo se pueden englobar los problemas que genera el diagnóstico diferencial del mesotelioma sarcomatoide pleural maligno de las hiperplasias mesoteliales benignas (pleuritis).

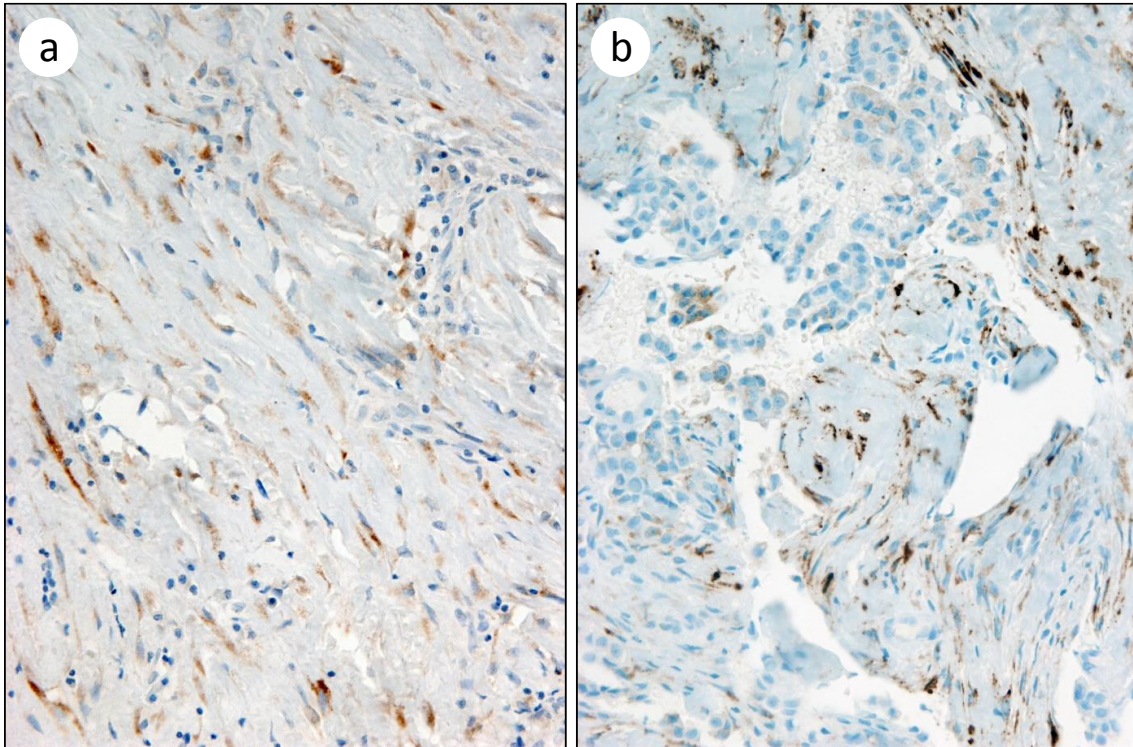
En cuanto al estudio de microinvasión, y en contra de lo que aparece publicado en la literatura, no observamos tinción de la matriz extracelular de los tumores pulmonares. Tan sólo se observó tinción positiva en 3 de los 10 casos de carcinoma epidermoide (Figura 16), mientras que ninguno de los ADC ni las lesiones benignas presentaron tinción alguna. Para descartar errores de la técnica se realizó por duplicado la inmunohistoquímica para todas las muestras.



**Figura 16: Inmunomarcaje para COL11A1 en distintos lesiones pulmonares.**  
a) Fibrosis pulmonar idiopática, b) adenocarcinoma y, c) carcinoma epidermoide (obsérvese la positividad). Contrastadas con Hematoxilina. Aumento original 200X.

En cuanto al estudio de la expresión diferencial entre mesoteliomas y pleuritis obtuvimos un resultado poco esclarecedor ya que con mayor o menor intensidad todas las muestras analizadas fueron positivas para la expresión de COL11A1. Sorprendentemente,

y en sintonía con la expresión citoplasmática de las células tumorales renales con diferenciación sarcomatoide, tanto los mesoteliomas como las pleuritis no presentaron tinción en los fibroblastos, sino en las células submesoteliales hiperplásicas (Figura 17).



**Figura 17: Inmunomarcaje para COL11A1 en lesiones pleurales**  
a) Pleuritis y, b) mesotelioma. Contrastadas con Hematoxilina. Aumento original 400X.



## ***DISCUSIÓN***



## Discusión

El presente trabajo muestra como la expresión del colágeno XI alfa 1 es un gran marcador predictivo de infiltración tumoral. Se ha demostrado que el inmunomarcaje de esta proteína en el estroma de los tumores de mama, colon, vejiga y ovario pronostica un fenómeno de invasión neoplásica con una altísima sensibilidad y especificidad que permitiría tomar decisiones terapéuticas en situaciones de incertidumbre diagnóstica. Además, parece que la expresión del COL11A1 puede ser un marcador de diferenciación sarcomatoide.

A continuación se discutirán brevemente los aspectos más importantes de este trabajo con la bibliografía más representativa sobre el tema.



### Colágeno XI alfa 1 como marcador de infiltración tumoral

Se ha descrito, mediante un meta-análisis, que la sobreexpresión (a nivel de RNA) del COL11A1 es un evento diferencial entre tumores de alto y bajo grado en distintos fenotipos cancerígenos<sup>89</sup>. Este estudio demuestra que la expresión de COL11A1 se encuentra en el entre los genes de mayor expresión diferencial en tumores de ovario, mama, colon y pulmón<sup>89</sup>. Además, son muchos los estudios, basados en perfiles de expresión, que proponen que la sobreexpresión del COL11A1 puede jugar un papel relevante como marcador diferenciador entre lesiones tumorales invasivas y no invasivas en esos mismos tumores<sup>66,68,70,90,91</sup> (Tabla 6). El presente trabajo contribuye de una manera significativa a apoyar y demostrar esta hipótesis, generando datos que demuestran la potencia diagnóstica de este marcador.

Tabla 6: Trabajos sobre la disregulación del COL11A1 en cáncer

| Tipo de Cáncer                  | Muestra                    | Disregulación     | Asociación clínica              | PMID     |
|---------------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------------|----------|
| <b>Vejiga</b>                   | Carcinoma invasivo         | Sobreexpresión    | Determinación invasión          | 23383328 |
| <b>Mama</b>                     | Carcinoma intraductal      | Inhibición        | Determinación metástasis        | 18660795 |
| <b>Mama</b>                     | Estroma tumoral            | Inhibición        | Reconocimiento estroma tumoral  | 18660795 |
| <b>Mama</b>                     | Carcinoma intraductal      | Sobreexpresión    | Determinación invasión          | 22514560 |
| <b>Mama</b>                     | Carcinoma intraductal      | Sobreexpresión    | Riesgo de metástasis            | 17123152 |
| <b>Mama</b>                     | Carcinoma intraductal      | Sobreexpresión    | Determinación invasión          | 22718308 |
| <b>Mama</b>                     | Carcinoma invasivo         | Sobreexpresión    | Fibroblastos asociados a cáncer | 25005174 |
| <b>Colorectal</b>               | Células tumorales          | Mutación          | Malignidad                      | 19337631 |
| <b>Colorectal (hereditario)</b> | Poliposis Familiar         | Sobreexpresión    | Malignidad                      | 11707154 |
| <b>Colorectal (esporádico)</b>  | Carcinoma invasivo         | Sobreexpresión    | Malignidad                      | 11375892 |
| <b>Gástrico</b>                 | Márgenes de resección      | Sobreexpresión    | Márgenes de resección           | 23145836 |
| <b>Gástrico</b>                 | Carcinoma invasivo         | Sobreexpresión    | Malignidad                      | 19306436 |
| <b>Glioma</b>                   | Glioblastoma               | Sobreexpresión    | Malignidad                      | 19351187 |
| <b>Glioma</b>                   | Glioblastoma               | Sobreexpresión    | Capacidad motilidad             | 20404328 |
| <b>Cabeza y cuello</b>          | Carcinoma invasivo         | Sobreexpresión    | Malignidad                      | 12874079 |
| <b>Cabeza y cuello</b>          | Carcinoma invasivo         | Sobreexpresión    | Determinación metástasis        | 24231953 |
| <b>Cabeza y cuello</b>          | Carcinoma Orofaringeo      | Sobreexpresión    | Determinación metástasis        | 15023835 |
| <b>Cabeza y cuello</b>          | Esófago                    | Amplificación ADN | Malignidad                      | 20083228 |
| <b>Pulmón</b>                   | NSCLC                      | Sobreexpresión    | Estadaje y pronóstico           | 17016581 |
| <b>Ovario</b>                   | Carcinoma epitelial        | Sobreexpresión    | Estadaje y pronóstico           | 23934190 |
| <b>Ovario</b>                   | Carcinoma seroso y mucosos | Sobreexpresión    | Pronóstico                      | 18698038 |
| <b>Ovario</b>                   | Cultivo celular            | Sobreexpresión    | Resistencia quimioterapia       | 24178762 |
| <b>Ovario</b>                   | Carcinoma seroso           | Sobreexpresión    | Determinación metástasis        | 24218511 |
| <b>Ovario</b>                   | Carcinoma epitelial        | Sobreexpresión    | Angiogénesis                    | 17327606 |
| <b>Pancreático</b>              | Carcinoma pancreático      | Sobreexpresión    | Fibroblastos asociados a cáncer | 24194920 |
| <b>Tiroides</b>                 | Sangre Periférica          | SNP               | Pronóstico                      | 22977629 |
| <b>Melanoma</b>                 | Melanoma                   | Sobreexpresión    | Determinación metástasis        | 23638386 |

Tabla adaptada de Raglow Z y Thomas SM<sup>62</sup>

El uso de muestras basadas en biopsias pequeñas poco invasiva (cilindros por aguja gruesa, resecciones transuretrales, biopsia endoscópica de colon) presenta una aproximación diagnóstica mucho más cercana a la clínica diaria que los artículos publicados hasta el momento, en donde se realiza el estudio de expresión sobre muestras quirúrgicas de resección<sup>89</sup>.

Además, para la realización de este trabajo se ha usado un anticuerpo extremadamente específico anti COL11A1<sup>92</sup>, ya que el COL11A1 presenta una alta homología con COL5A1, no sólo estructural, sino también funcional<sup>93</sup>. Ambos colágenos, 5 y 11, regulan el diámetro de los dos principales colágenos tipo I y II (respectivamente)<sup>94</sup>. Por lo tanto, el uso de un anticuerpo contra una región altamente específica de COL11A1 evita la reactividad cruzada con COL5A1 que podría generar falsos positivos. Además, el uso de un anticuerpo monoclonal mejora adicionalmente la especificidad y el uso de la forma inmadura del colágeno (procolágeno) proporciona un patrón de expresión citoplasmática intracelular, mucho más fácil de evaluar con respecto a la inmunotinción extracelular.

Cabe destacar que, para aquellos tumores donde se ha demostrado su utilidad, la expresión del COL11A1 predice la invasividad con una sensibilidad y especificidad altísima. De hecho, si analizamos todas las muestras de los distintos tipos tumorales en infiltrantes contra no infiltrantes nos encontramos con una sensibilidad acumulada de un 86% y una especificidad del 96% en una población de 350 muestras ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 7).

*Tabla 7: Inmunotinción para COL11A1 acumulada en todos los tumores*

|          | Infiltrante | No invasivo |
|----------|-------------|-------------|
| Positivo | 140         | 6           |
| Negativo | 23          | 177         |

Parece por tanto, que nos encontramos ante un marcador de infiltración extremadamente preciso y que, además, puede ser utilizado en el devenir clínico diario del estudio anatomopatológico de múltiples tumores.

A continuación, se comparará el valor predictivo del COL11A1 en cada tipo tumoral con las herramientas diagnósticas que se disponen en la actualidad, señalando sus ventajas e inconvenientes.

### Cáncer de Mama

Como se ha tratado previamente en la introducción, el correcto diagnóstico de las lesiones microinfiltrantes en el carcinoma mamario suponen, en muchos casos, un serio desafío para el patólogo, de hecho, son muchos los estudios publicados que demuestran la existencia de una gran subestimación diagnóstica en el potencial maligno de lesiones no infiltrativas<sup>95-97</sup>.

Para poder determinar la microinfiltración tumoral, los patólogos han dispuesto de diversos marcadores inmunohistoquímicos a lo largo de los años. El primero que se propuso se basó en la pérdida de la membrana basal como indicador de la invasión tumoral. Sin embargo, la inmunotinción de los componentes de dicha membrana como son la laminina o el colágeno IV dio bastantes problemas, puesto que se demostró que en las lesiones *in situ* se observaba también una pérdida variable de membrana basal<sup>98-100</sup>.

Posteriormente, se demuestra que la pérdida de células mioepiteliales, que rodean la glándula mamaria, parece ser un evento imprescindible en la transición de lesión *in situ* a infiltrante, por lo que se han presentado diversos marcadores para demostrar dicha ausencia<sup>101</sup>. Tanto la proteína S-100 como las citoqueratinas de alto peso molecular fueron rápidamente descartados por sus altas tasas de falsos negativos<sup>102,103</sup> y falsos

positivos respectivamente<sup>104,105</sup>. Otros marcadores, como la cadena pesada de la actina de músculo liso, pueden tener reacción cruzada con las células miofibroblásticas y generar falsos negativos<sup>106,107</sup>.

Actualmente, el uso de P63 y Calponina como marcadores de invasividad en cáncer de mama también está en entredicho. Al ser p63 un marcador nuclear la ausencia de señal puede deberse únicamente al corte histológico, provocando falsos positivos para infiltración. Así mismo, el rápido metabolismo de la Calponina puede dificultar su marcaje y por tanto generar falsos positivos<sup>108</sup>.

La utilización del COL11A1 como marcador de invasividad tumoral presenta una serie de ventajas sobre el resto de marcadores expuestos anteriormente.

En primer lugar y más importante se ha demostrado que en los casos más complicados, la sensibilidad diagnóstica del COL11A1 es mucho mayor que la Calponina y el P63. La selección de casos de carcinomas *in situ* con infiltración posterior se realizó con casos de diagnóstico real, en donde las herramientas basadas en la pérdida de células mioepiteliales habían fallado. Además, la realización de las técnicas en cortes consecutivos aumenta mucho la fiabilidad del experimento, pues se puede determinar la invasividad en la misma zona.

En cuanto a su interpretación, al ser el COL11A1 un marcador positivo facilita mucho el diagnóstico, ya que muchas veces, los tumores infiltrante están rodeados de lesión *in situ* que pueden dificultar la valoración correcta de un marcador de pérdida de señal<sup>98</sup>. Además, al ser un marcador de estroma y estar relacionado directamente con la infiltración, la utilización del COL11A1 es una gran ventaja en muestras pequeñas (cilindros), ya que a diferencia de los marcadores de pérdida de células mioepiteliales que requieren que la zona infiltrante esté presente en la biopsia<sup>78,109</sup>, el COL11A1 es capaz de

detectar los cambios estromales independientemente de que exista componente tumoral infiltrante

Por último, existe también una gran ventaja en cuanto a su simplicidad de interpretación como positivo/negativo. Otros marcadores como las calponina y la miosina han de realizarse en parejo para realizar un correcto diagnóstico puesto que a veces presentan cambios en la intensidad<sup>101</sup>. El COL11A1 presenta la suficiente sensibilidad y especificidad como para discriminar la infiltración como positiva o negativa incluso con la presencia de un solo fibroblasto teñido<sup>110</sup>.

### Cáncer de Colon

Clínicamente hablando, el principal valor de la resección de los adenomas colorrectales es su grado de relación con una patología tumoral maligna. La información sobre sus características histopatológicas es crucial para su manejo, ya que mientras que los pólipos *per se* son benignos, las neoplasias de alto riesgo y avanzadas requieren estrategias completamente diferentes para el tratamiento y el seguimiento. Dado que estas lesiones avanzadas se definen por su tamaño y su morfología, un muestreo tisular válido es un requisito imprescindible para las recomendaciones sobre terapia y vigilancia<sup>80</sup>.

Aunque la colonoscopia está considerada como la mejor herramienta para el cribado del cáncer colorectal<sup>111</sup>, esta técnica es claramente mejorable, debido al hecho de que existe un porcentaje de entre el 4,1 y el 7,2 de pacientes a los que se les ha hecho una colonoscopia que recidivan en un intervalo menor a 5 años<sup>112</sup>. En diversos estudios se concluye que el diagnóstico basado en la biopsia endoscópica de colon subestimó el diagnóstico histopatológico en aproximadamente el 10% de los adenomas colorrectales<sup>80</sup>.

Es por esto que se requieren herramientas que permitan predecir la malignidad de ese 10% de muestras que no obtienen un diagnóstico preciso.

La primera referencia que existe del papel de COL11A1 en el cáncer colorectal presenta datos sobre la sobreexpresión, medida en niveles de mRNA, de esta proteína en carcinomas esporádicos de colon comparados con tejido normal del colon<sup>113</sup>. Junto a estos son muchos los artículos que reconocen la alteración en la expresión del COL11A1 en muestras tumorales al compararlo con muestras no invasivas o tejido normal<sup>52,53,73</sup>. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha propuesto su utilización como biomarcador predictivo de infiltración en un contexto de diagnóstico clínico.

Este trabajo presenta la utilidad del COL11A1 en el diagnóstico diferencial de la infiltración en cáncer de colon. Hasta el momento, no se utiliza ninguna herramienta diagnóstica que facilite el diagnóstico en las lesiones complejas de colon, como pueden ser las microinfiltraciones de carcinomas asentados sobre pólipos adenomatosos<sup>114</sup>.

El trabajo, demuestra que la expresión del COL11A1 en las biopsias lleva asociado un mayor riesgo de infiltración. Además, en esta misma línea, y sorprendentemente, el COL11A1 parece estar también sobreexpresado en pólipos de colon de pacientes con poliposis familiar adenomatosa por mutación en APC<sup>70</sup>. Debido a que el tratamiento clínico de los pólipos es su resección, consideramos que sería muy interesante determinar este marcador en todos los pólipos, con la idea de realizar una detección precoz de aquellos pacientes que presenten una mayor predisposición a malignización o recidivas<sup>112</sup>.

Distintos estudios han presentado otras opciones con biomarcadores predictivos de malignidad, como la mutación del exón 54 del gen del COL11A1<sup>115</sup> o una firma de varios genes relacionados con la progresión<sup>116</sup>, con el fin de diferenciar los pólipos benignos de aquellos con predisposición maligna o carcinomas. No obstante, aunque no

se discute su utilidad clínica, técnicamente es mucho más sencillo la realización de una sola inmunohistoquímica que aporte el mismo resultado.

### Cáncer de Riñón

Los tumores renales son muy heterogéneos y en cada revisión de la clasificación se añaden nuevas entidades patológicas<sup>117</sup>. Los carcinomas de células renales (CCR) son el tipo más común y su variante cromófoba (CCRC) representa aproximadamente el 5% de todos los CCR malignos. Los oncocitomas renales benignos (OR) constituyen en torno al 3% -7% de todos los tumores renales en adultos<sup>118</sup>. Ambos tipos morfológicos se originan a partir de células intercaladas de los conductos colectores<sup>119</sup> y por tanto la diferenciación exacta entre ambos se complica<sup>120</sup>, sin embargo mientras que el oncocitoma tiene un comportamiento benigno, la variante cromófoba del carcinoma de células renales posee un potencial comportamiento maligno.

Existen en la literatura multitud de marcadores que pueden ayudar en el reconocimiento de los distintos subtipos tumorales renales. De la literatura se puede extraer que existen patrones de inmunomarcaje específico para las distintas variantes morfológicas<sup>82</sup>. Se ha demostrado que debido a la inactivación de VHL, los CCR expresan CD10 y Pax 2<sup>121,122</sup>. Los CCR con diferenciación Papilar presentan inmunotinción para vimentina, CK7 y AMACR y son negativos para CD117, cadherina, y parvalbúmina<sup>123,124</sup>. La variante cromófoba, sin embargo, es negativa para vimentina, pero muestra reactividad difusa para E-cadherina, parvalbúmina, CD117, EMA y CK7<sup>125,126</sup>. Diferenciar entre el oncocitoma benigno y el CCR cromófobo, sobre todo en su diferenciación eosinófila, es una tarea ardua ya que ambos tumores poseen características histológicas e inmunohistoquímicas confluyentes. La expresión de CK7



por los carcinomas cromóforos es el mejor marcador para diferenciar entre estas dos entidades tumorales, ya que el oncocitoma es generalmente negativo<sup>123,124</sup>.

No obstante, aún sigue habiendo mucha discusión en cuanto al diagnóstico diferencial de las distintas variedades tumorales renales, ya que el manejo de todos estos biomarcadores se antoja muy complejo<sup>127</sup>. En este punto la expresión de COL11A1 quizá podría ayudar en cuanto a su potencial de determinar la malignidad tumoral.

Los resultados del estudio de expresión de esta proteína en tumores renales parecen indicar que existe un marcaje diferencial entre los tumores de diferenciación sarcomatoide respecto del resto. Este marcador, por tanto, podría predecir un fenotipo sarcomatoide y ayudar en el diagnóstico de las entidades mixtas con el fin de determinar su malignidad<sup>128</sup>.

Cabe destacar no obstante que, aunque como marcador diferencial de morfología quizá no sea del todo robusto, la asociación entre la expresión de colágeno y la supervivencia es un evento muy interesante de estudio. Al igual que otra publicación, que predice que la sobreexpresión de marcadores de Transición Epitelio-Mesenquima como el COL11A1 conlleva un peor pronóstico<sup>129</sup>, el presente trabajo demuestra que la expresión de COL11A1 se asocia significativamente con una peor supervivencia. Se podría debatir, que este efecto puede atribuirse, más que a dicha expresión, a que la mayoría de los tumores que presentan inmunopositividad fueron de diferenciación sarcomatoide, al tener esta morfología, *per se*, una menor supervivencia asociada comparada con el resto de subtipos histológicos de carcinoma renal. No obstante, cabe destacar que otros 20 tumores no sarcomatoides también resultaron positivos para este marcador y que al analizarlos en ausencia de los sarcomatoides también se observa una supervivencia menor significativa.

## Cáncer de Vejiga

El estadio patológico es el factor pronóstico más importante en el carcinoma urotelial<sup>130</sup>. Cuando se identifica la invasión de la capa muscular propia (MP, pT2), generalmente se requiere un tratamiento definitivo (por ejemplo, cistectomía, quimioterapia sistémica o radioterapia). Los tumores que presentan estadio T1 (invasión limitada a la lámina propia) se manejan con tratamientos más conservadores aunque el procedimiento óptimo para estos tumores aún provoca mucha controversia<sup>131</sup>. En consecuencia, la estadificación patológica exacta del cáncer de vejiga en la resección transuretral (TUR) es crucial para el manejo adecuado de estos tumores. Sin embargo, debido a la propia naturaleza de la técnica de extracción de la muestra, tanto en tamaño como físicamente, puede provocar problemas diagnósticos<sup>131</sup>.

Los principales problemas que se encuentran en este tipo de biopsia se deben principalmente en la diferenciación de la MM de la MP, bien por fenómenos hiperpásicos en la primera o por la destrucción de la segunda debido a la propia invasión tumoral<sup>132,133</sup>. Además, los problemas intrínsecos de la técnica como son los especímenes limitado, la falta de orientación o los artefactos de cauterización dificultan en muchos momentos el diagnóstico preciso de los procesos de microinfiltración<sup>134</sup>.

Recientemente se ha descrito algunas proteínas que intentan ayudar en este diagnóstico de la infiltración. En concreto cabe destacar la Smoothelina, una proteína del citoesqueleto que se expresa específicamente en el músculo liso contráctil y que parece tener una fuerte expresión en la MP, mientras que la MM no lo presenta o es muy débil<sup>135-137</sup>. Sin embargo, existen artículos que abogan por un uso cuidadoso, ya que parece existir un patrón de inmunomarcaje solapante en la MM respecto a la MP llegando hasta el 25%<sup>131</sup>.

En el carcinoma transicional de vejiga sólo existe una referencia bibliográfica sobre su relación con el COL11A1. En concreto, al igual que nuestros resultados, el COL11A1 aparece como uno de los siete genes diferencialmente expresados al comparar invasión de MM contra MP<sup>138</sup>.

En este sentido, nuestro trabajo aporta dos ventajas con respecto a lo publicado anteriormente, la sola expresión del COL11A1 es capaz de predecir la infiltración de la muscular propia, y como es un cambio del estroma tumoral, no es dependiente de la presencia de la MP como si lo es la Smoothelina. Además, presenta unos rangos de sensibilidad y especificidad mucho mayores que los que se muestran en la bibliografía para la Smoothelina. El caso presentado apoya con gran fuerza la utilidad clínica diagnóstica del COL11A1 para predecir la infiltración en carcinomas transicionales de vejiga.

### Melanoma:

En 1970, Alexander Breslow propuso mediante varios estudios que el espesor tumoral de los melanomas afectaba de manera importante al pronóstico de la lesión<sup>139</sup>. El índice de Breslow marca 0.76 mm como límite en el proceso de metástasis, presentando los tumores más delgados un bajísimo potencial invasivo. Aunque posteriormente se han establecido otros puntos de corte<sup>140,141</sup>, queda patente que medir la profundidad del melanoma según el criterio propuesto por Alexander Breslow es un factor decisivo para la terapéutica posterior del melanoma<sup>142</sup>. La intención de la biopsia de piel, habitualmente mediante *punch* o escisión, tiene por tanto dos intenciones, por un lado el diagnóstico de la lesión, y por otro, si es melanoma, la determinación de su potencial invasivo.

Diagnosticar el melanoma con una profundidad de Breslow inexacta implica una actitud terapéutica incorrecta, que puede llevar a los pacientes a resecciones inadecuadas o a cirugías adicionales innecesarias. La determinación exacta de la profundidad del melanoma depende en gran medida de la técnica de la biopsia<sup>88</sup>. Diversos artículos demuestran que las técnicas de biopsia parcial, raspado o por punch subestiman la verdadera profundidad de la lesión entre 8% y 20% de las veces, incluso cuando la técnica la lleva a cabo un dermatólogo experimentado<sup>143</sup>. Se necesita por tanto un marcador que pueda determinar la infiltración pero que no sea tan dependiente de la técnica de extracción de muestra.

En este sentido, la idea de este trabajo es que la expresión del COL11A1 por el estroma tumoral predijera la invasión, al igual que pasa en otros tipos tumorales. Sin embargo, los datos derivados del estudio sugieren que en este tipo tumoral el COL11A1 no juega ningún papel.

Este resultado contradice lo anteriormente publicado en 2013 por Liu W *et al*<sup>144</sup>, que plantean una firma de 12 genes alterados en melanomas metastásicos respecto a lesiones benignas y piel normal en la que el COL11A1 se encuentra sobreexpresado en las células tumorales invasivas. Este trabajo, no obstante, puede ser rebatido principalmente por el uso de un anticuerpo comercial poco específico y que se ha visto (nosotros lo descartamos por ello) que puede tener reacción cruzada con el COL5A1<sup>92,93</sup>. De hecho, este es el único artículo que observa un marcaje citoplasmático de las células tumorales (salvo de origen mesenquimal) y no en el estroma, lo que podría encaminar a un falso positivo.

## Cáncer de Ovario

El pronóstico de los tumores borderline difiere en gran medida de los del carcinoma de ovario infiltrante. A diferencia de los pacientes con carcinomas ováricos infiltrantes, la mayoría de los pacientes con tumores borderline muestran excelentes tasas de supervivencia<sup>84</sup>. La tasa de supervivencia a los 5 años para los tumores borderline en estadio I es aproximadamente del 95% al 97%, e incluso los pacientes con tumores borderline en fases II o III tienen tasas de supervivencia a cinco años de más del 65%<sup>145</sup>.

El correcto diagnóstico de los tumores borderline es a menudo muy complejo. Estos tumores comparten características morfológicas con tumores infiltrantes malignos lo que a veces puede confundir al patólogo<sup>83</sup>. Existen estudios que han determinado que entre un 20 y 30% de los tumores diagnosticados borderline son en realidad, tumores infiltrantes<sup>146,147</sup>, principalmente en los tumores borderline en estadio III o IV<sup>148</sup>.

En los últimos años se han propuesto diversos biomarcadores para determinar el potencial maligno de los tumores borderline. Entre estos se encuentra la pérdida diferencial de p14<sup>149</sup> en tumores invasivos con respecto a borderline, aunque con una sensibilidad muy baja del 60%<sup>149</sup>, la sobreexpresión de la interleuquina 8 (IL-8) y sus receptores asociada a peor pronóstico<sup>150</sup> o paneles multigénicos para la tipificación de los tumores borderline y su pronóstico<sup>151</sup>.

Un estudio publicado por el grupo del doctor Wu, demostró que la expresión del COL11A1 era el gen más sobreexpresado en un ensayo de expresión sobre tumores de ovario y que correlacionaba con el estadio del tumor<sup>152</sup>. Posteriormente, se han presentado otros trabajos que apoyan la tesis de que existe una sobreexpresión del COL11A1 en tumores invasivos respecto a muestras no tumorales o epitelio normal y que, además, esta sobreexpresión se asocia con un peor pronóstico y una mayor tasa de recurrencia<sup>153,154</sup>.

Sin embargo, no hay ningún trabajo publicado sobre su aplicación clínica diagnóstica en el manejo y diferenciación de los tumores borderline.

Nuestros datos sugieren que si bien, el COL11A1 parece predecir la malignidad en sintonía con los artículos publicados hasta el momento, a diferencia de otros tipos tumorales presentados anteriormente, no tiene una sensibilidad suficientemente adecuada para su utilización en rutina diagnóstica. Según los datos publicados casi un 30% de los tumores infiltrantes podrían infravalorarse, por lo que no parece que mejore mucho la sensibilidad que resulta del estudio anatomopatológico convencional. Sería interesante, sin embargo, estudiar la conjunción de varios de los marcadores anteriormente citados (p14 o IL-8) con el COL11A1 para ver si se consigue una mayor sensibilidad diagnóstica.

### Cáncer de Pulmón

Al igual que en el cáncer de mama, la entrada de protocolos de detección precoz para el cáncer de pulmón, basados en técnicas radiológicas de baja exposición en pacientes con riesgo elevado de desarrollo de neoplasia<sup>75</sup>, parece cada vez más cercana. Con el gran beneficio que esto puede aportar al paciente y a la sociedad en general, esta práctica va a cambiar el espectro de lesiones a las que estamos acostumbrados a enfrentarnos en la práctica clínica. Este diagnóstico temprano puede provocar que ciertos elementos de carácter diagnóstico fundamental, como es el tamaño tumoral no puedan soportar la carga de marcador diferencial que tenían hasta ahora, aumentándose el número de neoplasias *in situ* y de pequeño tamaño.

En este contexto, la hiperplasia adenomatosa atípica, paradigma de las lesiones preneoplásicas en el pulmón, no debe ser más grande de 5 mm según la clasificación actual de la OMS<sup>155</sup>, sin embargo, con la llegada de tumores de descubrimiento incidental,

este límite no va a tener potencial diferenciador en el caso de los adenocarcinomas *in situ* que suelen ser mayores en tamaño. Por otro lado existen similitudes citomorfológicas entre las lesiones preneoplásicas y el adenocarcinoma *in situ*, y así causan problemas de sobrediagnóstico e infradiagnóstico en las biopsias limitadas con el problema inherente de falta de representatividad. Por el momento, no se han descrito marcadores eficaces que resuelvan el problema, por lo que se recomienda no realizar el diagnóstico de estas entidades en biopsias pequeñas, tales como biopsias transbronquiales o biopsias por aguja gruesa transtorácica<sup>76</sup> sino en biopsias quirúrgicas que recojan completamente la lesión.

Este problema cambiará como ya hemos puesto de manifiesto con la llegada de los programas de cribado poblacional que precisará un diagnóstico mucho más seguro en biopsias diagnósticas para asegurar un tratamiento quirúrgico apropiado a cada caso. Parece, por tanto imprescindible la llegada de nuevos marcadores que faciliten los diagnósticos diferenciales.

Al igual que en los apartados anteriores hemos determinado una expresión diferencial significativa del COL11A1 en carcinomas pulmonares invasivos con respecto al pulmón normal o a lesiones no invasiva. Diferentes publicaciones han comunicado una sobreexpresión a nivel de mRNA del COL11A1 en carcinomas pulmonares no microcíticos<sup>156,157</sup>, así como la correlación con el estadio patológico, la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y un mal pronóstico<sup>66,158</sup>, incluso se ha determinado que la manera en el que esta proteína se sobreexpresa podría ser por una hipometilación del promotor<sup>159</sup>. Sin embargo, no exista ninguna publicación que sugiera la utilización de este marcador en los procedimientos de diagnóstico anatomopatológico.

El presente trabajo no aporta, por desgracia, una respuesta a este problema. La expresión del COL11A1 en las muestras analizadas de carcinomas infiltrantes no se correlaciona con la bibliografía existente sobre el tema hasta el momento. Aunque la

transformación de los datos obtenidos en estudios de mRNA a proteínas (estudios de microarrays *vs* inmunohistoquímica) a veces resulta una tarea ardua, por no encontrarse herramientas adecuadas, no parece que sea la razón en nuestro caso, ya que poseemos un anticuerpo que está perfectamente validado para las muestras usadas. No obstante, aunque las bondades del anticuerpo (que han sido descritas con anterioridad) sean muchas, la utilización de un anticuerpo monoclonal muy específico es un arma de doble filo ya que es tremendamente dependiente de la fijación del tejido<sup>160-162</sup>.

Esta misma experiencia se dio en el estudio del tejido mamario al utilizar piezas quirúrgicas, pero se resolvió con el uso de biopsias pequeñas (por aguja gruesa) en las que la fijación formólica está mucho más controlada. Sin embargo, debido a varios factores como la dificultad de encontrar biopsias pulmonares pequeñas con sospecha diagnóstica de lesión preneoplásica, el hecho de que alguna de las muestras de carcinomas epidermoides fueran positivas en piezas quirúrgicas (así como todo el estudio en pleura) y la falta de tiempo y presupuesto nos impidió seguir profundizando en el tema.

Como se presenta en la introducción el único elemento fiable a la hora del diagnóstico de malignidad en biopsia pleural es la infiltración de áreas profundas por parte de las células mesoteliales. Los pocos biomarcadores que se han presentado como p53<sup>163</sup> o el Glut1<sup>164</sup> han caído en desuso por su falta de sensibilidad.

Al igual que en el apartado anterior, el COL11A1 parece no tener mucho que decir en este problema, ya que tiñe ambas patologías por igual. Sin embargo, cabe destacar que la tinción encontrada fue en las células submesoteliales hiperplásicas y no en los fibroblastos como en el resto de los modelos estudiados.

Este hecho, sumado a la tinción de la población sarcomatoide en los carcinomas renales sugiere que el COL11A1 podría ser un marcador diferencial de células epiteliales con transdiferenciación hacia fenotipos mesenquimales.



En este sentido el COL11A1 se comporta como un marcador excelente de mesotelioma sarcomatoide, algo que requiere mayor profundización al tratarse de una neoplasia frente a la que carecemos de marcadores inmunohistoquímicos adecuados. De hecho, la mayor parte de los anticuerpos comunicados como de utilidad en el diagnóstico diferencial del mesotelioma frente a otros tipos de carcinomas (fundamentalmente pulmonares) son la Calretinina, WT1, D2-40<sup>165</sup> que en el caso del mesotelioma sarcomatoide se expresan más raramente.

### COL11A1 como marcador mesenquimal y de TEM

La observación de expresión citoplasmática de COL11A1 en células con un fenotipo mesenquimal como la diferenciación sarcomatoide de los carcinomas renales o las células submesoteliales pleurales, unida a su expresión por fibroblastos reactivos asociados a cáncer hace pensar que la expresión de esta proteína podría ser un claro ejemplo de marcador del proceso de transición epitelio mesénquima.

Este hallazgo plantea más dudas aún sobre el fenómeno de transdiferenciación celular que ocurre en el tumor. Es decir, cómo células de origen epitelial como las del carcinoma renal, sufren una transformación fenotípica, que les hace producir un tipo de colágeno característico únicamente de células mesenquimales fibroblásticas.

Aunque existen diversas teorías del origen del estroma que circunda el tumor (y probablemente la realidad sea una mezcla de ambas), los datos derivados de este trabajo parecen apuntar en la dirección de una rediferenciación de las propias células tumorales hacia fenotipos más mesenquimales (lo que vendría apoyado por la expresión del COL11A1 en la diferenciación sarcomatoide del carcinoma renal).

En esta misma línea Sok *et al* demuestran en su estudio que existe una expresión aumentada (en niveles de mRNA) de COL11A1 en células epiteliales y fibroblastos asociados a tumor respecto a fibroblastos normales en carcinomas escamosos de cabeza y cuello, concluyendo que podría haber una relación más amplia que la bioquímica entre las células tumorales y los fibroblastos asociados a tumor<sup>166</sup>.

Adicionalmente, otros autores han identificado células estromales en cáncer de colon que expresaban al mismo tipo COL11A1, actina  $\alpha$  de músculo liso y vimentina a nivel citoplasmático<sup>73</sup>. Si tenemos en cuenta que los miofibroblastos normales no expresan estos marcadores, estaríamos ante la presencia de una célula maligna con la propiedad de movimiento y modificación de su microambiente a través del colágeno.

Todas estas evidencias indican que quizá el COL11A1 sea algo más que un simple marcador de invasividad o incluso de transición epitelio mesénquima, y pueda convertirse en una diana terapéutica con un potencial de acción en diversos tipos de tumores, como así ya lo reflejan algunas publicaciones<sup>152,153,166</sup>.



## ***CONCLUSIONES***



## Conclusiones

1. El COL11A1 en fibroblastos asociados a cáncer demuestra ser un marcador diferencial entre las lesiones in situ e infiltrantes en la patología neoplásica de la mama, con una especificidad y sensibilidad muy por encima de los marcadores existentes actualmente.
2. La expresión del COL11A1 por los fibroblastos asociados a carcinomas in situ asentados sobre adenomas del colon puede predecir la presencia de áreas de microinfiltración ocultas con una elevada sensibilidad.
3. El inmunomarcaje positivo para COL11A1 en fibroblastos estromales presentes en resecciones transuretrales de vejiga urinaria es capaz de predecir un estadio pT2 oculto con una alta sensibilidad, incluso en ausencia de muscular propia en el tejido analizado.
4. Aunque la expresión de COL11A1 por los fibroblastos asociados a lesiones tumorales ováricas infiltrantes esta significativamente aumentada, la sensibilidad de esta técnica no se considera la suficiente como para ser un biomarcador diferencial efectivo.
5. El COL11A1 se asocia a la diferenciación sarcomatoide en el carcinoma de células renales. Su expresión se relaciona significativamente con un peor pronóstico independientemente del tipo histológico en tumores renales.

6. No se han encontrado diferencias significativas en la expresión del COL11A1 al comparar melanomas malignos con nevus melanocíticos.
7. La expresión de COL11A1 en fibroblastos asociados a cáncer no permite predecir la invasividad en tumores pulmonares.
8. La expresión de COL11A1 en células mesoteliales hiperplásicas y en mesoteliomas malignos difusos no permite el diagnóstico diferencial entre ambas entidades, pudiendo ser un marcador de linaje celular más que de infiltración.
9. Existe expresión citoplasmática de COL11A1 en células neoplásicas del carcinoma sarcomatoide renal que puede ser indicativa de un proceso de transición epitelio-mesénquima en dichas células.
10. Los datos del presente trabajo demuestran, por tanto, que el COL11A1 se comporta como un excelente marcador de infiltración tumoral en diversas localizaciones y que resultaría muy útil su implementación en la práctica diaria del patólogo.

## ***BIBLIOGRAFÍA***





## Bibliografía

- 1 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* **66**, 7-30, doi:10.3322/caac.21332 (2016).
- 2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 3 David, A. R. & Zimmerman, M. R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nature reviews. Cancer* **10**, 728-733, doi:10.1038/nrc2914 (2010).
- 4 Hipocrates. *Sobre las enfermedades de las mujeres. Tratados Hipocráticos*. Vol. Vol IV (Gredos, 1988).
- 5 Adams. *Galeno. Complete works*. (1856).
- 6 MacGregor, A. B. The search for a chemical cure for cancer. *Medical history* **10**, 374-385 (1966).
- 7 Waldron, H. A. A brief history of scrotal cancer. *British journal of industrial medicine* **40**, 390-401 (1983).

- 8 R, V. Patología Celular. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* (1855).
- 9 Jaramillo, J. *El cáncer. Fundamentos de oncología.* , Universidad de Costa Rica, ( 1991).
- 10 Thrift, A. P. & Whiteman, D. C. Can we really predict risk of cancer? *Cancer epidemiology* **37**, 349-352, doi:10.1016/j.canep.2013.04.002 (2013).
- 11 Ahn, J. S., Eom, C. S., Jeon, C. Y. & Park, S. M. Acid suppressive drugs and gastric cancer: a meta-analysis of observational studies. *World journal of gastroenterology* **19**, 2560-2568, doi:10.3748/wjg.v19.i16.2560 (2013).
- 12 Diergaarde, B. & Kurta, M. L. Use of fertility drugs and risk of ovarian cancer. *Current opinion in obstetrics & gynecology* **26**, 125-129, doi:10.1097/GCO.0000000000000060 (2014).
- 13 Hernando Requejo, O. & Rubio Rodriguez, M. C. Nutrition and cancer. *Nutricion hospitalaria* **32 Suppl 1**, 67-72, doi:10.3305/nh.2015.32.sup1.9483 (2015).
- 14 Boffetta, P. Environment and cancer risk. *La Revue du praticien* **63**, 1122-1125 (2013).
- 15 Gibbons, D. L., Byers, L. A. & Kurie, J. M. Smoking, p53 mutation, and lung cancer. *Molecular cancer research : MCR* **12**, 3-13, doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0539 (2014).
- 16 Reynolds, P. Smoking and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **18**, 15-23, doi:10.1007/s10911-012-9269-x (2013).
- 17 Varela-Rey, M., Woodhoo, A., Martinez-Chantar, M. L., Mato, J. M. & Lu, S. C. Alcohol, DNA methylation, and cancer. *Alcohol research : current reviews* **35**, 25-35 (2013).

- 18 Underner, M., Urban, T., Perriot, J., de Chazeron, I. & Meurice, J. C. Cannabis smoking and lung cancer. *Revue des maladies respiratoires* **31**, 488-498, doi:10.1016/j.rmr.2013.12.002 (2014).
- 19 Alonso-Sardon, M. *et al.* Association between Occupational Exposure to Wood Dust and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one* **10**, e0133024, doi:10.1371/journal.pone.0133024 (2015).
- 20 Nielsen, L. S. *et al.* Occupational asbestos exposure and lung cancer--a systematic review of the literature. *Archives of environmental & occupational health* **69**, 191-206, doi:10.1080/19338244.2013.863752 (2014).
- 21 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 22 Jin, T., Song, T., Deng, S. & Wang, K. Radiation-induced secondary malignancy in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Urologia internationalis* **93**, 279-288, doi:10.1159/000356115 (2014).
- 23 Sena, J. S. *et al.* Occupational skin cancer: Systematic review. *Revista da Associacao Medica Brasileira* **62**, 280-286, doi:10.1590/1806-9282.62.03.280 (2016).
- 24 Gao, P. & Zheng, J. Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic viruses--related cancers. *Cancer letters* **303**, 1-8, doi:10.1016/j.canlet.2010.12.021 (2011).
- 25 Syrjanen, S. & Rautava, J. HPV and cancer. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja* **131**, 1765-1774 (2015).
- 26 Xu, C., Zhou, W., Wang, Y. & Qiao, L. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* **345**, 216-222, doi:10.1016/j.canlet.2013.08.035 (2014).

- 27 Perri, F. *et al.* Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma: the other side of the coin. *Anti-cancer drugs* **26**, 1017-1025, doi:10.1097/CAD.0000000000000276 (2015).
- 28 Vockerodt, M. *et al.* The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *The Journal of pathology* **235**, 312-322, doi:10.1002/path.4459 (2015).
- 29 Miles, S. A. Pathogenesis of HIV-related Kaposi's sarcoma. *Current opinion in oncology* **6**, 497-502 (1994).
- 30 Mitsudomi, T. *et al.* Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* **11**, 121-128, doi:10.1016/S1470-2045(09)70364-X (2010).
- 31 Hobbs, G. A., Der, C. J. & Rossman, K. L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science* **129**, 1287-1292, doi:10.1242/jcs.182873 (2016).
- 32 Rahman, M. A., Salajegheh, A., Smith, R. A. & Lam, A. K. B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer. *Experimental and molecular pathology* **95**, 336-342, doi:10.1016/j.yexmp.2013.10.005 (2013).
- 33 Johnson, G. L., Stuhlmiller, T. J., Angus, S. P., Zawistowski, J. S. & Graves, L. M. Molecular pathways: adaptive kinome reprogramming in response to targeted inhibition of the BRAF-MEK-ERK pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 2516-2522, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1081 (2014).
- 34 Dobbin, Z. C. & Landen, C. N. The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer. *International journal of molecular sciences* **14**, 8213-8227, doi:10.3390/ijms14048213 (2013).

- 35 Quintas-Cardama, A. & Verstovsek, S. Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 1933-1940, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0284 (2013).
- 36 Wahlstrom, T. & Henriksson, M. A. Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **1849**, 563-569, doi:10.1016/j.bbagr.2014.07.004 (2015).
- 37 Knudson, A. G., Jr. Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. *Cancer* **63**, 1888-1891 (1989).
- 38 Robles, A. I. & Harris, C. C. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a001016, doi:10.1101/cshperspect.a001016 (2010).
- 39 Rebouissou, S. *et al.* CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *The Journal of pathology* **227**, 315-324, doi:10.1002/path.4017 (2012).
- 40 Ye, Y. *et al.* Relations of tumor suppressor gene p16 and RB to early diagnosis of lung cancer. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]* **38**, 885-889 (2000).
- 41 Hansford, S. *et al.* Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA oncology* **1**, 23-32, doi:10.1001/jamaoncol.2014.168 (2015).
- 42 Girolimetti, G. *et al.* BRCA-associated ovarian cancer: from molecular genetics to risk management. *BioMed research international* **2014**, 787143, doi:10.1155/2014/787143 (2014).

- 43 Li, S. *et al.* MYC/BCL2 double-hit high-grade B-cell lymphoma. *Advances in anatomic pathology* **20**, 315-326, doi:10.1097/PAP.0b013e3182a289f2 (2013).
- 44 Tian, X., Chen, B. & Liu, X. Telomere and telomerase as targets for cancer therapy. *Applied biochemistry and biotechnology* **160**, 1460-1472, doi:10.1007/s12010-009-8633-9 (2010).
- 45 Feng, Q. Y. *et al.* Anti-EGFR and anti-VEGF agents: important targeted therapies of colorectal liver metastases. *World journal of gastroenterology* **20**, 4263-4275, doi:10.3748/wjg.v20.i15.4263 (2014).
- 46 Johnson, R. W. *et al.* Wnt signaling induces gene expression of factors associated with bone destruction in lung and breast cancer. *Clinical & experimental metastasis* **31**, 945-959, doi:10.1007/s10585-014-9682-1 (2014).
- 47 Bacac, M. & Stamenkovic, I. Metastatic cancer cell. *Annual review of pathology* **3**, 221-247, doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151523 (2008).
- 48 Gupta, G. P. & Massague, J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**, 679-695, doi:10.1016/j.cell.2006.11.001 (2006).
- 49 Steeg, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature medicine* **12**, 895-904, doi:10.1038/nm1469 (2006).
- 50 Sipos, F. & Muzes, G. Isolated lymphoid follicles in colon: switch points between inflammation and colorectal cancer? *World journal of gastroenterology* **17**, 1666-1673, doi:10.3748/wjg.v17.i13.1666 (2011).
- 51 Avizienyte, E., Brunton, V. G., Fincham, V. J. & Frame, M. C. The SRC-induced mesenchymal state in late-stage colon cancer cells. *Cells, tissues, organs* **179**, 73-80, doi:10.1159/000084511 (2005).

- 52 Brabletz, T. *et al.* Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer research* **64**, 6973-6977, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1132 (2004).
- 53 Kirkland, S. C. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *British journal of cancer* **101**, 320-326, doi:10.1038/sj.bjc.6605143 (2009).
- 54 Moustakas, A. & Heldin, C. H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer science* **98**, 1512-1520, doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00550.x (2007).
- 55 Bissell, M. J. & Hines, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine* **17**, 320-329, doi:10.1038/nm.2328 (2011).
- 56 Pein, M. & Oskarsson, T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. *American journal of physiology. Cell physiology* **309**, C627-638, doi:10.1152/ajpcell.00145.2015 (2015).
- 57 Muschler, J. & Streuli, C. H. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a003202, doi:10.1101/cshperspect.a003202 (2010).
- 58 Oskarsson, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast* **22 Suppl 2**, S66-72, doi:10.1016/j.breast.2013.07.012 (2013).
- 59 Insua-Rodriguez, J. & Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced drug delivery reviews* **97**, 41-55, doi:10.1016/j.addr.2015.12.017 (2016).



- 60 Egeblad, M., Rasch, M. G. & Weaver, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current opinion in cell biology* **22**, 697-706, doi:10.1016/j.ceb.2010.08.015 (2010).
- 61 Lochter, A. & Bissell, M. J. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. *Seminars in cancer biology* **6**, 165-173, doi:10.1006/scbi.1995.0017 (1995).
- 62 Raglow, Z. & Thomas, S. M. Tumor matrix protein collagen XI $\alpha$ 1 in cancer. *Cancer letters* **357**, 448-453, doi:10.1016/j.canlet.2014.12.011 (2015).
- 63 Vazquez-Villa, F. *et al.* COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **36**, 2213-2222, doi:10.1007/s13277-015-3295-4 (2015).
- 64 Blaschke, U. K., Eikenberry, E. F., Hulmes, D. J., Galla, H. J. & Bruckner, P. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *The Journal of biological chemistry* **275**, 10370-10378 (2000).
- 65 Kleman, J. P., Hartmann, D. J., Ramirez, F. & van der Rest, M. The human rhabdomyosarcoma cell line A204 lays down a highly insoluble matrix composed mainly of alpha 1 type-XI and alpha 2 type-V collagen chains. *European journal of biochemistry* **210**, 329-335 (1992).
- 66 Shen, L. *et al.* COL11A1 is overexpressed in recurrent non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation, migration, invasion and drug resistance. *Oncology reports* **36**, 877-885, doi:10.3892/or.2016.4869 (2016).

- 67 Halsted, K. C. *et al.* Collagen alpha1(XI) in normal and malignant breast tissue. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **21**, 1246-1254, doi:10.1038/modpathol.2008.129 (2008).
- 68 Garcia-Pravia, C. *et al.* Overexpression of COL11A1 by cancer-associated fibroblasts: clinical relevance of a stromal marker in pancreatic cancer. *PloS one* **8**, e78327, doi:10.1371/journal.pone.0078327 (2013).
- 69 Zhao, Y. *et al.* A potential role of collagens expression in distinguishing between premalignant and malignant lesions in stomach. *Anatomical record* **292**, 692-700, doi:10.1002/ar.20874 (2009).
- 70 Fischer, H. *et al.* COL11A1 in FAP polyps and in sporadic colorectal tumors. *BMC cancer* **1**, 17 (2001).
- 71 Anastassiou, D. *et al.* Human cancer cells express Slug-based epithelial-mesenchymal transition gene expression signature obtained in vivo. *BMC cancer* **11**, 529, doi:10.1186/1471-2407-11-529 (2011).
- 72 Polanska, U. M. & Orimo, A. Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. *Journal of cellular physiology* **228**, 1651-1657, doi:10.1002/jcp.24347 (2013).
- 73 Galvan, J. A. *et al.* Validation of COL11A1/procollagen 11A1 expression in TGF-beta1-activated immortalised human mesenchymal cells and in stromal cells of human colon adenocarcinoma. *BMC cancer* **14**, 867, doi:10.1186/1471-2407-14-867 (2014).
- 74 Steliarova-Foucher, E. *et al.* The European Cancer Observatory: A new data resource. *European journal of cancer* **51**, 1131-1143, doi:10.1016/j.ejca.2014.01.027 (2015).

- 75 International Early Lung Cancer Action Program, I. *et al.* Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *The New England journal of medicine* **355**, 1763-1771, doi:10.1056/NEJMoa060476 (2006).
- 76 Butnor, K. J. Avoiding underdiagnosis, overdiagnosis, and misdiagnosis of lung carcinoma. *Archives of pathology & laboratory medicine* **132**, 1118-1132, doi:10.1043/1543-2165(2008)132[1118:AUOAMO]2.0.CO;2 (2008).
- 77 Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **62**, 10-29, doi:10.3322/caac.20138 (2012).
- 78 Brennan, M. E. *et al.* Ductal carcinoma in situ at core-needle biopsy: meta-analysis of underestimation and predictors of invasive breast cancer. *Radiology* **260**, 119-128, doi:10.1148/radiol.11102368 (2011).
- 79 Vermeer, N. C. *et al.* Colorectal cancer screening: Systematic review of screen-related morbidity and mortality. *Cancer treatment reviews* **54**, 87-98, doi:10.1016/j.ctrv.2017.02.002 (2017).
- 80 Gondal, G. *et al.* Biopsy of colorectal polyps is not adequate for grading of neoplasia. *Endoscopy* **37**, 1193-1197, doi:10.1055/s-2005-921031 (2005).
- 81 Sircar, K., Rao, P., Jonasch, E., Monzon, F. A. & Tamboli, P. Contemporary approach to diagnosis and classification of renal cell carcinoma with mixed histologic features. *Chinese journal of cancer* **32**, 303-311, doi:10.5732/cjc.012.10136 (2013).
- 82 Moch, H. *et al.* Biomarkers in renal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **464**, 359-365, doi:10.1007/s00428-014-1546-1 (2014).
- 83 Guida, M. *et al.* Underestimation of ovarian pathology: a review. *Journal of chemotherapy* **9**, 135-137, doi:10.1179/joc.1997.9.2.135 (1997).

- 84 Seong, S. J., Kim da, H., Kim, M. K. & Song, T. Controversies in borderline ovarian tumors. *Journal of gynecologic oncology* **26**, 343-349, doi:10.3802/jgo.2015.26.4.343 (2015).
- 85 Ramirez-Backhaus, M., Dominguez-Escrig, J., Collado, A., Rubio-Briones, J. & Solsona, E. Restaging transurethral resection of bladder tumor for high-risk stage Ta and T1 bladder cancer. *Current urology reports* **13**, 109-114, doi:10.1007/s11934-012-0234-4 (2012).
- 86 Dalbagni, G., Herr, H. W. & Reuter, V. E. Impact of a second transurethral resection on the staging of T1 bladder cancer. *Urology* **60**, 822-824; discussion 824-825 (2002).
- 87 Balch, C. M. *et al.* Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **19**, 3622-3634, doi:10.1200/JCO.2001.19.16.3622 (2001).
- 88 Kaiser, S., Vassell, R., Pinckney, R. G., Holmes, T. E. & James, T. A. Clinical impact of biopsy method on the quality of surgical management in melanoma. *Journal of surgical oncology* **109**, 775-779, doi:10.1002/jso.23580 (2014).
- 89 Kim, H., Watkinson, J., Varadan, V. & Anastassiou, D. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC medical genomics* **3**, 51, doi:10.1186/1755-8794-3-51 (2010).
- 90 Ellsworth, R. E. *et al.* A gene expression signature that defines breast cancer metastases. *Clinical & experimental metastasis* **26**, 205-213, doi:10.1007/s10585-008-9232-9 (2009).

- 91 Vargas, A. C. *et al.* Gene expression profiling of tumour epithelial and stromal compartments during breast cancer progression. *Breast cancer research and treatment* **135**, 153-165, doi:10.1007/s10549-012-2123-4 (2012).
- 92 Garcia-Ocana, M. *et al.* Characterization of a novel mouse monoclonal antibody, clone 1E8.33, highly specific for human procollagen 11A1, a tumor-associated stromal component. *International journal of oncology* **40**, 1447-1454, doi:10.3892/ijo.2012.1360 (2012).
- 93 Yoshioka, H. *et al.* Structural and functional analysis of the promoter of the human alpha 1(XI) collagen gene. *The Journal of biological chemistry* **270**, 418-424 (1995).
- 94 Bernard, M. *et al.* Cloning and sequencing of pro-alpha 1 (XI) collagen cDNA demonstrates that type XI belongs to the fibrillar class of collagens and reveals that the expression of the gene is not restricted to cartilagenous tissue. *The Journal of biological chemistry* **263**, 17159-17166 (1988).
- 95 Houssami, N., Ciatto, S., Ellis, I. & Ambrogetti, D. Underestimation of malignancy of breast core-needle biopsy: concepts and precise overall and category-specific estimates. *Cancer* **109**, 487-495, doi:10.1002/cncr.22435 (2007).
- 96 Jackman, R. J. *et al.* Stereotactic breast biopsy of nonpalpable lesions: determinants of ductal carcinoma in situ underestimation rates. *Radiology* **218**, 497-502, doi:10.1148/radiology.218.2.r01fe35497 (2001).
- 97 O'Flynn, E. A. *et al.* Prediction of the presence of invasive disease from the measurement of extent of malignant microcalcification on mammography and ductal carcinoma in situ grade at core biopsy. *Clinical radiology* **64**, 178-183, doi:10.1016/j.crad.2008.08.007 (2009).

- 98 Pinder, S. E. *et al.* in *WHO Classification of Tumours of the breast* (eds S. R. Lakhani *et al.*) Ch. Microinvasive carcinoma, 95-97 (IARC press, 2012).
- 99 Raymond, W. A. & Leong, A. S. Assessment of invasion in breast lesions using antibodies to basement membrane components and myoepithelial cells. *Pathology* **23**, 291-297 (1991).
- 100 Willebrand, D., Bosman, F. T. & de Goeij, A. F. Patterns of basement membrane deposition in benign and malignant breast tumours. *Histopathology* **10**, 1231-1241 (1986).
- 101 Yaziji, H., Gown, A. M. & Sneige, N. Detection of stromal invasion in breast cancer: the myoepithelial markers. *Advances in anatomic pathology* **7**, 100-109 (2000).
- 102 Dwarakanath, S. *et al.* S-100 protein positivity in breast carcinomas: a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry. *Hum Pathol* **18**, 1144-1148 (1987).
- 103 Egan, M. & Smith, K. E. S100 protein and myoepithelial cells of breast. *J Clin Pathol* **40**, 1485-1486 (1987).
- 104 Gottlieb, C., Raju, U. & Greenwald, K. A. Myoepithelial cells in the differential diagnosis of complex benign and malignant breast lesions: an immunohistochemical study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **3**, 135-140 (1990).
- 105 Heatley, M., Maxwell, P., Whiteside, C. & Toner, P. Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease. *J Clin Pathol* **48**, 26-32 (1995).
- 106 Bocker, W. *et al.* An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin, collagen

IV and laminin. Part I: Normal breast and benign proliferative lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **421**, 315-322 (1992).

107 Ellis, I. & Tavassoli, F. A. in *World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of the breast and female genital organs* (eds F. A. Tavassoli & P. Devilee) Ch. Tumours of the breast, 74-75 (IARC press, 2003).

108 Frid, M. G., Shekhonin, B. V., Koteliansky, V. E. & Glukhova, M. A. Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin. *Dev Biol* **153**, 185-193, doi:0012-1606(92)90104-O [pii] (1992).

109 Ciatto, S. *et al.* Accuracy and underestimation of malignancy of breast core needle biopsy: the Florence experience of over 4000 consecutive biopsies. *Breast cancer research and treatment* **101**, 291-297, doi:10.1007/s10549-006-9289-6 (2007).

110 Freire, J. *et al.* Collagen, type XI, alpha 1: an accurate marker for differential diagnosis of breast carcinoma invasiveness in core needle biopsies. *Pathology, research and practice* **210**, 879-884, doi:10.1016/j.prp.2014.07.012 (2014).

111 Rex, D. K. *et al.* American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *The American journal of gastroenterology* **104**, 739-750, doi:10.1038/ajg.2009.104 (2009).

112 Haque, T., Greene, K. G. & Crockett, S. D. Serrated neoplasia of the colon: what do we really know? *Current gastroenterology reports* **16**, 380, doi:10.1007/s11894-014-0380-6 (2014).

113 Fischer, H., Stenling, R., Rubio, C. & Lindblom, A. Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. *Carcinogenesis* **22**, 875-878 (2001).

- 114 Burt, R. & Jass, J. R. in *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System* (eds Stanley R. Hamilton & Lauri A. Aaltonen) Ch. Tumours of the colon and rectum, 135-137 (IARC press, 2000).
- 115 Suceveanu, A. I. *et al.* Introduction of cytogenetic tests in colorectal cancer screening. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD* **18**, 33-38 (2009).
- 116 Drew, J. E. *et al.* Predictive gene signatures: molecular markers distinguishing colon adenomatous polyp and carcinoma. *PloS one* **9**, e113071, doi:10.1371/journal.pone.0113071 (2014).
- 117 Samaratunga, H., Gianduzzo, T. & Delahunt, B. The ISUP system of staging, grading and classification of renal cell neoplasia. *Journal of kidney cancer and VHL* **1**, 26-39, doi:10.15586/jkcvhl.2014.11 (2014).
- 118 Kawaguchi, S. *et al.* Most renal oncocytomas appear to grow: observations of tumor kinetics with active surveillance. *The Journal of urology* **186**, 1218-1222, doi:10.1016/j.juro.2011.05.080 (2011).
- 119 Delongchamps, N. B. *et al.* Hybrid tumour 'oncocytoma-chromophobe renal cell carcinoma' of the kidney: a report of seven sporadic cases. *BJU international* **103**, 1381-1384, doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08263.x (2009).
- 120 Ng, K. L. *et al.* A systematic review and meta-analysis of immunohistochemical biomarkers that differentiate chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma. *J Clin Pathol* **69**, 661-671, doi:10.1136/jclinpath-2015-203585 (2016).
- 121 Boysen, G. *et al.* Identification and functional characterization of pVHL-dependent cell surface proteins in renal cell carcinoma. *Neoplasia* **14**, 535-546 (2012).



122 Luu, V. D. *et al.* Loss of VHL and hypoxia provokes PAX2 up-regulation in clear cell renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 3297-3304, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2779 (2009).

123 Skinnider, B. F. & Amin, M. B. An immunohistochemical approach to the differential diagnosis of renal tumors. *Seminars in diagnostic pathology* **22**, 51-68 (2005).

124 Skinnider, B. F. *et al.* Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. *The American journal of surgical pathology* **29**, 747-754 (2005).

125 Golovastova, M. O. *et al.* Biomarkers of Renal Tumors: the Current State and Clinical Perspectives. *Current urology reports* **18**, 3, doi:10.1007/s11934-017-0655-1 (2017).

126 Srigley, J. R. *et al.* The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *The American journal of surgical pathology* **37**, 1469-1489, doi:10.1097/PAS.0b013e318299f2d1 (2013).

127 Nordling, S. Cytokeratin 14 is not a specific marker for renal oncocytomas. *The American journal of surgical pathology* **30**, 1337, doi:10.1097/01.pas.0000213304.21058.6c (2006).

128 Gu, L. *et al.* Presence of sarcomatoid differentiation as a prognostic indicator for survival in surgically treated metastatic renal cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* **143**, 499-508, doi:10.1007/s00432-016-2304-3 (2017).

129 Boguslawska, J. *et al.* Expression of Genes Involved in Cellular Adhesion and Extracellular Matrix Remodeling Correlates with Poor Survival of Patients with

Renal Cancer. *The Journal of urology* **195**, 1892-1902, doi:10.1016/j.juro.2015.11.050 (2016).

130 Eble JN, Sauter G & JI., E. in *WHO Classification of Tumors* (ed Sesterhenn IA) ( IARC Press;, 2004).

131 Miyamoto, H., Sharma, R. B., Illei, P. B. & Epstein, J. I. Pitfalls in the use of smoothelin to identify muscularis propria invasion by urothelial carcinoma. *The American journal of surgical pathology* **34**, 418-422, doi:10.1097/PAS.0b013e3181ce5066 (2010).

132 Paner, G. P. *et al.* Further characterization of the muscle layers and lamina propria of the urinary bladder by systematic histologic mapping: implications for pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. *The American journal of surgical pathology* **31**, 1420-1429, doi:10.1097/PAS.0b013e3180588283 (2007).

133 Vakar-Lopez, F. *et al.* Muscularis mucosae of the urinary bladder revisited with emphasis on its hyperplastic patterns: a study of a large series of cystectomy specimens. *Annals of diagnostic pathology* **11**, 395-401, doi:10.1016/j.anndiagpath.2006.12.014 (2007).

134 Jimenez, R. E., Keane, T. E., Hardy, H. T. & Amin, M. B. pT1 urothelial carcinoma of the bladder: criteria for diagnosis, pitfalls, and clinical implications. *Advances in anatomic pathology* **7**, 13-25 (2000).

135 Kramer, J. *et al.* A novel isoform of the smooth muscle cell differentiation marker smoothelin. *Journal of molecular medicine* **77**, 294-298 (1999).

136 Paner, G. P. *et al.* Diagnostic use of antibody to smoothelin in the recognition of muscularis propria in transurethral resection of urinary bladder tumor (TURBT) specimens. *The American journal of surgical pathology* **34**, 792-799, doi:10.1097/PAS.0b013e3181da7650 (2010).

137 Paner, G. P. *et al.* Diagnostic utility of antibody to smoothelin in the distinction of muscularis propria from muscularis mucosae of the urinary bladder: a potential ancillary tool in the pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. *The American journal of surgical pathology* **33**, 91-98, doi:10.1097/PAS.0b013e3181804727 (2009).

138 Ewald, J. A., Downs, T. M., Cetnar, J. P. & Ricke, W. A. Expression microarray meta-analysis identifies genes associated with Ras/MAPK and related pathways in progression of muscle-invasive bladder transition cell carcinoma. *PloS one* **8**, e55414, doi:10.1371/journal.pone.0055414 (2013).

139 Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery* **172**, 902-908 (1970).

140 Buttner, P. *et al.* Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* **75**, 2499-2506 (1995).

141 Day, C. L., Jr. *et al.* The natural break points for primary-tumor thickness in clinical Stage I melanoma. *The New England journal of medicine* **305**, 1155, doi:10.1056/NEJM198111053051916 (1981).

142 Lorusso, G. D., Sarma, D. P. & Sarwar, S. F. Punch biopsies of melanoma: a diagnostic peril. *Dermatology online journal* **11**, 7 (2005).

143 Ng, P. C., Barzilai, D. A., Ismail, S. A., Averitte, R. L., Jr. & Gilliam, A. C. Evaluating invasive cutaneous melanoma: is the initial biopsy representative of the final depth? *Journal of the American Academy of Dermatology* **48**, 420-424, doi:10.1067/mjd.2003.106 (2003).

- 144 Liu, W., Peng, Y. & Tobin, D. J. A new 12-gene diagnostic biomarker signature of melanoma revealed by integrated microarray analysis. *PeerJ* **1**, e49, doi:10.7717/peerj.49 (2013).
- 145 Trope, C., Davidson, B., Paulsen, T., Abeler, V. M. & Kaern, J. Diagnosis and treatment of borderline ovarian neoplasms "the state of the art". *European journal of gynaecological oncology* **30**, 471-482 (2009).
- 146 Burger, C. W., Prinssen, H. M., Baak, J. P., Wagenaar, N. & Kenemans, P. The management of borderline epithelial tumors of the ovary. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **10**, 181-197 (2000).
- 147 Tempfer, C. B., Polterauer, S., Bentz, E. K., Reinthaller, A. & Hefler, L. A. Accuracy of intraoperative frozen section analysis in borderline tumors of the ovary: a retrospective analysis of 96 cases and review of the literature. *Gynecologic oncology* **107**, 248-252, doi:10.1016/j.ygyno.2007.06.008 (2007).
- 148 Prat Díaz de Losada, J. Tumores Ováricos Borderline (de Bajo Potencial de Malignidad). *Revista Española de Patología* **40**, 201-216, doi:10.1016/S1699-8855(07)70080-6 (2007).
- 149 Cabral, V. D., Cerski, M. R., Sa Brito, I. T. & Kliemann, L. M. p14 expression differences in ovarian benign, borderline and malignant epithelial tumors. *Journal of ovarian research* **9**, 69, doi:10.1186/s13048-016-0275-2 (2016).
- 150 Browne, A. *et al.* Differential expression of IL-8 and IL-8 receptors in benign, borderline and malignant ovarian epithelial tumours. *Cytokine* **64**, 413-421, doi:10.1016/j.cyto.2013.05.006 (2013).
- 151 Curry, E. W. *et al.* Molecular subtypes of serous borderline ovarian tumor show distinct expression patterns of benign tumor and malignant tumor-associated

signatures. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **27**, 433-442, doi:10.1038/modpathol.2013.130 (2014).

152 Wu, Y. H., Chang, T. H., Huang, Y. F., Huang, H. D. & Chou, C. Y. COL11A1 promotes tumor progression and predicts poor clinical outcome in ovarian cancer. *Oncogene* **33**, 3432-3440, doi:10.1038/onc.2013.307 (2014).

153 Cheon, D. J. *et al.* A collagen-remodeling gene signature regulated by TGF-beta signaling is associated with metastasis and poor survival in serous ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 711-723, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1256 (2014).

154 Teng, P. N. *et al.* Identification of candidate circulating cisplatin-resistant biomarkers from epithelial ovarian carcinoma cell secretomes. *British journal of cancer* **110**, 123-132, doi:10.1038/bjc.2013.687 (2014).

155 Travis, W., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A. & Nicholson, A. *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart.* (IARC Press, 2015).

156 Tian, Z. Q. *et al.* Identification of Commonly Dysregulated Genes in Non-small-cell Lung Cancer by Integrated Analysis of Microarray Data and qRT-PCR Validation. *Lung* **193**, 583-592, doi:10.1007/s00408-015-9726-6 (2015).

157 Weng, T. Y. *et al.* Differential Expression Pattern of THBS1 and THBS2 in Lung Cancer: Clinical Outcome and a Systematic-Analysis of Microarray Databases. *PloS one* **11**, e0161007, doi:10.1371/journal.pone.0161007 (2016).

158 Chong, I. W. *et al.* Great potential of a panel of multiple hMTH1, SPD, ITGA11 and COL11A1 markers for diagnosis of patients with non-small cell lung cancer. *Oncology reports* **16**, 981-988 (2006).

159 Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K. & Eckhardt, F. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new

biomarkers in lung cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**, 1494-1508, doi:10.1016/j.biocel.2007.11.018 (2008).

160 Combs, S. E. *et al.* Loss of antigenicity with tissue age in breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **96**, 264-269, doi:10.1038/labinvest.2015.138 (2016).

161 Grillo, F. *et al.* Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochemistry and cell biology* **144**, 93-99, doi:10.1007/s00418-015-1316-4 (2015).

162 Xie, R. *et al.* Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **59**, 356-365, doi:10.1369/0022155411398488 (2011).

163 Cagle, P. T., Brown, R. W. & Lebovitz, R. M. p53 immunostaining in the differentiation of reactive processes from malignancy in pleural biopsy specimens. *Hum Pathol* **25**, 443-448 (1994).

164 Husain, A. N. *et al.* How useful is GLUT-1 in differentiating mesothelial hyperplasia and fibrosing pleuritis from epithelioid and sarcomatoid mesotheliomas? An international collaborative study. *Lung cancer* **83**, 324-328, doi:10.1016/j.lungcan.2013.12.009 (2014).

165 Comin, C. E. *et al.* Expression of thrombomodulin, calretinin, cytokeratin 5/6, D2-40 and WT-1 in a series of primary carcinomas of the lung: an immunohistochemical study in comparison with epithelioid pleural mesothelioma. *Tumori* **100**, 559-567, doi:10.1700/1660.18182 (2014).

166 Sok, J. C. *et al.* Collagen type XI alpha1 facilitates head and neck squamous cell cancer growth and invasion. *British journal of cancer* **109**, 3049-3056, doi:10.1038/bjc.2013.624 (2013).