

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS
MOLECULARES



**Evaluación preclínica y caracterización
molecular de terapias antiangiogénicas
en Carcinomas Neuroendocrinos. Papel
de Galectina-1 como mediador de
respuesta**

TESIS DOCTORAL

MARÍA RODRÍGUEZ REMÍREZ

MADRID, 2019

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**Evaluación preclínica y caracterización
molecular de terapias antiangiogénicas
en Carcinomas Neuroendocrinos. Papel
de Galectina-1 como mediador de
respuesta**

Memoria de Investigación presentada por **María Rodríguez Remírez**, Licenciada en Biología y Bioquímica, para optar al grado de **Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid**

Trabajo dirigido por la Dra. Arancha Cebrián Aranda y el Dr. Jesús García-Foncillas López

MADRID, 2019



Don Jesús García-Foncillas López, Doctor en Medicina y Profesor Titular de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid y Doña Arancha Cebrián Aranda, Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Doña María Rodríguez Remírez, Licenciada en Biología y Bioquímica por la Universidad de Navarra, ha realizado en la Unidad de Oncología Traslacional del Instituto de Investigación Sanitaria – Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral.

Madrid, a 27 de Febrero de 2019,

Dr. Jesús García-Foncillas López

Dra. Arancha Cebrián Aranda

A mi tío

“Vi tantas liebres correr sin sentido...
que aprendí a ser tortuga y apreciar el recorrido”

Anónimo

Los carcinomas neuroendocrinos (CNE), son considerados una enfermedad rara, suponen aproximadamente entre 10-20% de todas las neoplasias neuroendocrinas (NNE) diagnosticadas y su supervivencia media está alrededor de los 10 meses. Son tumores que, al diagnóstico, presentan enfermedad avanzada y metástasis. A día de hoy el único tratamiento aprobado es la quimioterapia basada en cisplatino/etopósido en primera línea, con una segunda línea no definida.

Los CNE presentan una elevada actividad angiogénica caracterizada por una alta expresión de factores proangiogénicos, como son los miembros de la familia del factor de crecimiento vascular (VEGF). Por este motivo, este trabajo plantea la evaluación *in vivo* de dos tratamientos antiangiogénicos, aflibercept y bevacizumab, en dos modelos de xenoinjerto murinos desarrollados a partir de células humanas de CNE de colon y pulmón. Nuestros resultados demuestran que ambos fármacos tienen una actividad antitumoral elevada en ambos modelos, siendo especialmente llamativo el efecto denominado de “estabilidad tumoral” inducido por aflibercept en el modelo de pulmón.

En el estudio de los mecanismos relacionados con la actividad antitumoral asociada a las terapias antiangiogénicas estudiadas, los resultados muestran que las diferencias de inhibición de crecimiento tumoral con aflibercept entre ambos modelos son debidas, al menos en parte, a los diferentes niveles de expresión de la proteína Galectina-1 (Gal-1). Los tumores generados a partir de la línea de CNE de pulmón presentaban altos niveles de Gal-1 que eran significativamente reducidos con aflibercept. Dicha reducción afectó directamente a procesos vitales para el desarrollo del tumor tales como la invasión celular, la transición epitelio-mesénquima y la desestructuración de la matriz extracelular. Estos resultados no se observaron en el modelo derivado de la línea de CNE de colon cuyos tumores presentaban niveles apenas detectables de Gal-1, sugiriendo que esta proteína puede convertirse en un potencial marcador predictivo para el tratamiento con aflibercept.

El análisis de Gal-1 en un pequeño grupo de pacientes con CNE confirmó que tumores con origen pancreático o pulmonar presentaban niveles elevados de esta proteína mientras que los CNE de colon mostraban niveles similares a sus correspondientes tejidos normales. Estos resultados junto la alta eficacia de aflibercept demostrada en el modelo preclínico con elevados niveles de Gal-1 abren la puerta al uso de este antiangiogénico en pacientes cuyos tumores sobreexpresen Gal-1.

Neuroendocrine carcinomas (NEC) are considered a rare disease. Approximately, they represent 10-20% of all diagnosed neuroendocrine neoplasms (NEN), and their median survival is around 10 months. These tumors debut with advanced disease and metastasis at diagnosis. So far, chemotherapy scheme based on cisplatin/etoposide is the unique therapy as first line, and after relapse, the second treatment line is not well defined.

NECs show a high angiogenic activity characterized by an over expression of proangiogenic factors, such as vascular growth factor (VEGF) family. For this reason, this work proposes the *in vivo* evaluation of two antiangiogenic treatments, aflibercept and bevacizumab, in two murine xenograft models developed from human colon and lung CNE cell lines. Our results show that both drugs exert a high antitumor activity in both models, being especially striking the "tumor stability" induced by aflibercept in the lung model.

Regarding to the potential mechanisms associated with the antitumoral activity of antiangiogenic therapies analyzed in this study, the results show that the differences of tumor growth inhibition by aflibercept between both xenograft models are due, at least partially, to the different protein levels of Galectin-1 (Gal-1). Tumors derived from lung NEC cell line showed high levels of Gal-1 that were significantly reduced by aflibercept. This reduction directly affects essential processes for tumor development such as cell invasion, transition epithelium-mesenchyma and the extracellular matrix remodeling. These effects were not observed in xenograft model from colon CNE cell line whose tumors show almost undetectable Gal-1 levels, suggesting that this protein could be a potential predictive marker of aflibercept treatment.

Analysis of Gal-1 in a set of patients with NEC confirmed that tumors with pancreatic or pulmonary origin showed high levels of this protein whereas colon NECs showed similar levels as their matched normal tissues. These results together with the high efficacy of aflibercept demonstrated in the preclinical model with high levels of Gal-1 open the door to the use of this antiangiogenic as therapy in patients whose tumors overexpress Gal-1.

RESUMEN/ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	23
1. Neoplasias Neuroendocrinas	25
1.1 Epidemiología e incidencia	25
1.2 Clasificación de las NNEs	26
1.3 Diagnóstico patológico y tratamiento de las Neoplasias neuroendocrinas.....	28
1.4 Angiogénesis y neoplasias neuroendocrinas	30
1.5 Biología molecular de los CNE.....	34
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1 Cultivos celulares.....	41
3.2 Modelo animal	42
3.2.1 Medidas para evaluar la actividad antitumoral	43
3.2.2 Medidas para evaluar la estabilización tumoral	43
3.2.3 Tumor Control Index	43
3.3 Extracción y procesamiento del tumor	44
3.4 Microarray Tisular (TMA)	44
3.5 Inmunodetecciones.....	45
3.5.1 Inmunohistoquímica	45
3.5.2 Inmunofluorescencia.....	46
3.6 Western Blot	47
3.7 Enzimoimmunoensayo (ELISA: Enzyme-Linked Inmonosorbent Assay en ingles)	48
3.8 Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en Tiempo Real.....	49
3.10 Generación de librerías y análisis de secuenciación	50
3.11 Análisis estadístico	51
RESULTADOS	53
4.1 Efecto de los fármacos aflibercept y bevacizumab en el desarrollo y crecimiento tumoral in vivo de los CNEs	55
4.2 Efecto de los fármacos aflibercept y bevacizumab en la parada o reducción del crecimiento tumoral.....	57
4.3 SL Tumor Control Index Macro como método alternativo para evaluar la cinética del crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto.	59

4.4 Análisis molecular de los tumores derivados de los modelos de xenoinjerto	60
4.4.1 Caracterización molecular	60
4.4.2 Análisis de la expresión de VEGF-A, VEGF-B y PlGF como dianas de aflibercept y bevacizumab.....	61
4.5 Papel de aflibercept más allá de su interacción con ligandos VEGF.....	62
4.5.1 Efecto de los tratamientos anti-VEGF sobre la expresión de Gal-1.....	62
4.5.2 Efecto de aflibercept en la vía angiogénica dependiente de Gal-1	68
4.5.3 Efecto de aflibercept en la motilidad celular y la remodelación de la matriz extracelular a través de la modulación de Gal-1	68
4.5.4 Efecto del aflibercept en la transición epitelio-mesénquima a través de la señalización por Galectina-1.....	69
4.6 Cribado de la expresión de Galectina-1 en pacientes con CNEs	76
4.7 Perfiles de expresión génica en los tumores generados en los dos modelos de xenoinjerto.....	77
DISCUSIÓN	83
5.1 Origen neuroendocrino de las líneas NCI-H460 Y COLO320 HDR.	85
5.2 Actividad antitumoral generada por el efecto de los tratamientos anti-VEGF	86
5.3 Efecto antitumoral de aflibercept dependiente de galectina-1	88
5.4 Galectina-1 como marcador de respuesta en CNEs	91
5.5 Perfiles de expresión génica, nuevas rutas moduladas por antiangiogénicos.....	92
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXO	112

5FU	5-Fluorouracilo
ANG	Angiopoyetina
ASS	Análogos de Somatostatina
ATCC	American Type Cell Collection
CA	Carcinoide atípico
CAP	Capecitabina
CgA	Cromogranina A
CNCG	Carcinoma Neuroendocrino de célula grande
CCP	Carcinoma de célula pequeña
CNE	Carcinoma Neuroendocrino
CPCP	Cáncer de pulmón de célula pequeña
CT	Carcinoide típico
EDTA	Ácido atilendiaminotetracético
ENETS	Sociedad Europea de Tumores Neuroendocrinos
FAC	Fibroblastos asociados a cáncer
FOLFIRI	Combinación de leucovorina, fluorouracilo e irinotecan
FOLFOX	Combinación de leucovorina, fluorouracilo y oxaliplatino
GEP	Gastroenteropancreaticos
INF- α	Interferon – alpha
NNE	Neoplasia Neuroendocrine
NRP-1	Neuropilina-1
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIGF	Factor de crecimiento placentario
RIPA	Radioinmunoprecipitación assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SG	Supervivencia Global
SLP	Supervivencia libre de progresión
STZ	Estreptozocina
TBS	Tampón tris salino
TEM	Temozolamida
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TMA	Microarray tisular
TNE	Tumores Neuroendocrinos
TTBS	Tampón Tween-20 tris salino
VEGF	Factor de crecimiento vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular
α -SMA	actina- α de músculo liso
STF	Solución de tampón fosfato
TCI	Tumor Control Index
ARN	Acido Ribonucleico
ADN	Acido Dexosiribonucleico
H&E	Hematoxilina & Eosina
ASB	Albúmina sérica bovina

INTRODUCCIÓN

1. Neoplasias Neuroendocrinas

1.1 Epidemiología e incidencia

Las neoplasias neuroendocrinas (NNEs) constituyen un grupo heterogéneo de tumores originados en las células neuroendocrinas. Pueden localizarse en cualquier parte del cuerpo, incluyendo glándulas endocrinas (hipófisis, médula adrenal, páncreas) y numerosos órganos con células endocrinas dispersas (tubo digestivo, tracto biliar, pulmón y bronquios, timo, sistema urogenital) (1). Los últimos datos recogidos sobre la incidencia de estos tumores muestran un incremento significativo, estimándose 6,98 casos por cada 100.000 habitantes al año (2). La prevalencia de estos tumores ha aumentado sustancialmente en las últimas tres décadas como respuesta a las nuevas técnicas de diagnóstico, convirtiéndose en la segunda neoplasia avanzada más prevalente del tracto digestivo tras el cáncer colorrectal (3). Si tenemos en cuenta su lugar de origen, estas neoplasias se desarrollan con mayor frecuencia en el sistema gastrointestinal (GI) y en el sistema broncopulmonar (4). Teniendo en cuenta estos dos sistemas principales, el 60% de las NNEs se desarrollarían en el sistema gastrointestinal y el 28% en el broncopulmonar (Figura 1).

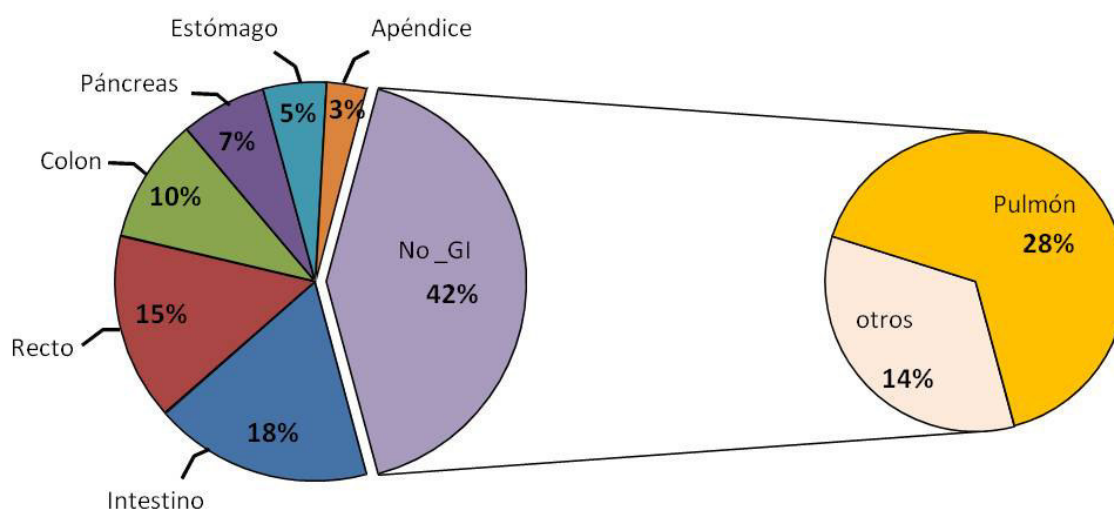


Figura 1. Distribución de las NNEs según su localización en el organismo. Adaptado de Frilling A, Akerström G, Pavel M, Ramos J, Kidd M, Modlin IM. Neuroendocrine tumor disease: an evolving landscape. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Sep 14;19(5):R163-85

Respecto a la supervivencia de estos pacientes varía en función del grado de diferenciación, el estadio y la localización. Si tenemos en cuenta la localización podemos confirmar que las NNEs de peor pronóstico son las localizadas en páncreas o pulmón con una mediana de supervivencia significativamente más baja que en el resto de localizaciones, 3,6 y 5,5 años, respectivamente ($P < 0,001$) (2). Teniendo en cuenta el grado de diferenciación tumoral, los datos recogidos de supervivencia global (SG) nos muestran como conforme disminuye la diferenciación la supervivencia

se reduce. La mediana de supervivencia de los pacientes con tumores grado 1 (G1) - bien diferenciados, presenta los valores más altos (16,2 años); en el caso de los pacientes con tumores G2 - bien diferenciados, estos valores bajan significativamente (8,3 años) y los pacientes con tumores pobremente diferenciados (G3 y G4), y por tanto mucho más agresivos, la supervivencia es muy baja (10 meses). Entre el 10-20 % de todas las NNEs diagnosticadas, pertenecen al grupo de tumores pobremente diferenciados y su supervivencia puede ser tan baja como 4 - 6 meses para aquellos pacientes que no reciben un tratamiento (5).

1.2 Clasificación de las NNEs

La terminología que engloba a las NNEs, ha sido muy confusa desde los primeros intentos de su clasificación. En 1963, Williams y Sandler agruparon estos tumores dependiendo de su lugar de origen en el tracto digestivo: anterior, medio o posterior. En 1972, se comenzó a tener en cuenta la histología de la célula; carcinoide típico vs carcinoide atípico. A partir de 1980, la Organización Mundial de la Salud (OMS), aplicó el término carcinoide para describir a todas las NNEs exceptuando las de pulmón. Esta clasificación también dio lugar a una terminología confusa ya que los patólogos, aplicaban el término carcinoide a todos los tumores del sistema endocrino.

A finales del siglo XX - comienzos del siglo XXI, la OMS clasifica las NNEs de pulmón y timo en 4 subtipos según su agresividad: Tumores carcinoides típicos, de bajo grado y con altas expectativas de vida; tumores carcinoides atípicos, con un grado intermedio y más agresivos clínicamente; y los carcinomas neuroendocrinos de célula grande (CNCG) y de célula pequeña (CCP), de alto grado y muy mal pronóstico. Además, se revisa la clasificación de las NNEs gastroenteropancreáticas (GEP) y se establecen tres categorías histológicas independientemente del sitio de origen: Tumor neuroendocrino (TNE) bien diferenciados, con un comportamiento benigno; TNE bien diferenciados, con un comportamiento incierto; y Carcinomas neuroendocrinos (CNE), pobremente diferenciados y con un comportamiento maligno (6).

Desde el año 2004, la OMS ha ido incorporando nuevos criterios a tener en cuenta en la clasificación de estas neoplasias, como son el índice mitótico y el porcentaje de necrosis. En 2010 la OMS junto con la Sociedad Europea de Tumores Neuroendocrinos (ENETS- *European Neuroendocrine Tumors Society*) introducen un nuevo criterio de clasificación basado en el índice de proliferación, que divide las NNEs en TNE de bajo grado (G1) con un Ki67<2%; TNE de grado intermedio (G2), Ki67>2-20%; y CNE de alto grado (G3) con un Ki67>20% (7).

Tras las nuevas actualizaciones realizadas por la OMS en 2017, en referencia a las NNEs G3, establecen una nueva clasificación, específicamente en las NNEs pancreáticas, basándose en los

estudios realizados por Heetfeld M. *et al.* en 2015. Estos autores afirman que no todos los G3 son pobremente diferenciados y que según su morfología y su grado podemos dividirlos en dos grupos; TNE - G3, bien diferenciados y con un índice de proliferación entre 20 y 55%, y los CNE – G3, pobremente diferenciados y en su mayoría con un Ki67 mayor del 55% (5) (Tabla 1).

Actualmente existen pocos estudios que apoyen la aplicación de esta nueva clasificación de los G3 bien diferenciados para las NNEs gastrointestinales. De tal manera que se está haciendo un gran esfuerzo en analizar con mayor profundidad aquellos casos G3 con un Ki67 entre el 20 y el 50%, ya que las opciones terapéuticas podrían variar dependiendo de su diferenciación.

Tabla 1. Clasificación de las NNEs según grado y morfología

NNEs	Morfología (diferenciación)	Grado (% Ki67)
Tumor neuroendocrino-G1 (TNE-G1)	Bien diferenciado	G1 (<2%)
Tumor neuroendocrino-G2 (TNE-G2)	Bien diferenciado	G2 (2-20%)
Tumor neuroendocrino-G3 (TNE-G3)*	Bien diferenciado	G3 (20%-55%)
Carcinoma neuroendocrino (CNE)*	Pobremente diferenciado	G3 (>55%)

*La clasificación de los G3 está actualmente aprobada solo para las NNEs pancreáticas.

En 2015 la OMS, confirmando lo ya descrito anteriormente, mantiene la clasificación de las NNEs de pulmón en 4 subtipos histológicos: carcinoide típico (CT), carcinoide atípico (CA) y carcinoma neuroendocrino de célula grande (CNCG) y de célula pequeña (CCP). Las diferencias entre los subtipos siguen los mismos criterios, basándose principalmente en el índice mitótico, junto con los niveles de Ki67 y la presencia o ausencia de necrosis (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las NNE de pulmón en subtipos histológicos

Subtipos histológicos	Grado	Índice Mitótico	Ki67 (%)	Necrosis	OMS
Carcinoide típico (CT)	Bajo grado	<2	<5	-	TNE – G1
carcinoide atípico (CA)	Grado Intermedio	2-10	20-25	+	TNE – G2
Carcinoma de célula pequeña (CCP)	Alto Grado	>10	60-100	+++	CNE – G3
Carcinoma neuroendocrino de célula grande (CNCG)	Alto Grado	>10	60-100	+++	CNE – G3

Ausencia de necrosis (-); necrosis moderada (+); necrosis elevada (+++)

1.3 Diagnóstico patológico y tratamiento de las Neoplasias neuroendocrinas

A la hora de diagnosticar este tipo de neoplasias el patólogo desempeña un papel fundamental. Aunque es cierto que el resultado dependerá de la calidad de la muestra y de la información clínica proporcionada. El diagnóstico suele ser morfológico y radiológico (lesiones hipervasculares). Cuando se sospecha estar ante un TNE por presentar células pequeñas, cromatina en sal y pimienta y poco citoplasma, se piden los marcadores inmunohistoquímicos como la cromogranina A (CgA) y la sinaptofisina (8), que nos ayudan a identificar su naturaleza neuroendocrina. A continuación se determina el grado según la actividad mitótica con H&E o tinción de Ki67 como marcador de proliferación y cuyo valor permite ajustar mejor el manejo del paciente en función de si el tumor es de alto o bajo grado (9). Cuando el material que obtenemos es una pieza grande, a todo esta información hay que añadir datos como la invasión vascular o perineural y si toca o no márgenes de resección. Para realizar el seguimiento de metástasis se suele usar el octreoscan, un marcaje con octreótido, para valorar posibles depósitos metastásicos.

1.3.1 Tumores Neuroendocrinos

El tratamiento de los tumores neuroendocrinos ha ido progresando con el paso de los años, gracias a las nuevas técnicas de diagnóstico y a su mayor especificidad. Son tumores normalmente indolentes apareciendo los síntomas clínicos en aquellos pacientes con enfermedad avanzada y pueden ser síntomas asociados al propio tumor o a un síndrome hormonal (10).

Tras el diagnóstico de un TNE G1-G2, con enfermedad localizada, la primera opción de tratamiento es la cirugía y dependerá de su localización y de la afectación ganglionar. Si el tumor no es resecable y presenta metástasis en el momento del diagnóstico, la primera opción es un tratamiento sistémico basado en análogos de somatostatina (ASS), como octreotide LAR (estudio PROMID) (11) o Lanreotide (estudio CLARINET) (12). Tras una progresión a esta primera línea, no está bien definido qué tratamiento sería el más indicado. Ante la alta expresión de receptores de somatostatina se planteó la opción de utilizar isótopos radioactivos, como el Itrio-90 o Lutecio -177, que se unen a los receptores. Un estudio fase 3 con 177-Lu-Dotatate (Lutathera) demostró un beneficio en la supervivencia libre de progresión (SLP) en aquellos pacientes inoperables y con progresión a los análogos de somatostatina (octreotide) (13). El uso de interferon-alpha (INF- α) también mejoraba ligeramente los síntomas y estabilizaba la enfermedad, pero varios estudios en los que se utilizó en combinación con ASS (octreotide LAR) no obtuvieron diferencias significativas en la supervivencia (14). Los estudios RADIANT evalúan la combinación de everolimus (inhibidor de mTOR) y octreotide LAR en pacientes con TNE gastrointestinales, pancreáticos o de pulmón. Estos ensayos han obtenido

resultados positivos en SLP para los TNE de pulmón (15,16). De forma similar al everolimus también se está utilizando el sunitinib como terapia a la progresión de ASS (Figura 2).

Para los TNE G2, con alta carga tumoral y/o progresión de la enfermedad, existe la opción de quimioterapia citotóxica basada en diferentes combinaciones: estreptozocina (STZ) con 5-Fluorouracilo (5-FU) o doxorubicina, y capecitabina (CAP) más temozolamina (TEM) como quimioterapia alternativa si la basada en STZ no está disponible.

Actualmente se reconoce un nuevo grupo de tumores neuroendocrinos bien diferenciados, cuyo índice de proliferación se encuentra entre el 20 y el 55%, y que se clasifican como G3. El tratamiento óptimo para estos tumores (aprobado para TNE-G3 pancreáticos) es el utilizado para los TNE G1 y G2, incluyendo la TEM o la STZ. Como tratamiento a la progresión de esta primera línea estaría la quimioterapia basada en platino/etopósido (5,17,18) (Figura 2).

1.3.2 Carcinomas Neuroendocrinos

Los pacientes diagnosticados con un CNE, desarrollado tanto a nivel gastrointestinal, pulmonar o pancreático, presentan características biológicas similares a un CPCP. Una progresión muy rápida de la enfermedad, con un comportamiento muy agresivo y una alta probabilidad de desarrollar metástasis. Debido a esta similitud, el tratamiento en primera línea aprobado para estos pacientes es la quimioterapia basada en cisplatino, como por ejemplo cisplatino/etopósido, pudiendo remplazar el cisplatino por carboplatinos (estudio NORDIC) (17,19). Aunque la mediana de SLP sigue siendo muy baja, entre 4 y 6 meses, y finalmente todos los pacientes progresan (20,21). La segunda línea de tratamiento no está definida, incluye opciones como FOLFOX, FOLFIRI (22,23) o TEM (24), pero sin una mejora significativa en la respuesta y la SLP es siempre menor de 3-4 meses (Figura 2).

El pronóstico tan desfavorable para los pacientes con un CNE y las escasas opciones de tratamiento, nos obliga a buscar alternativas terapéuticas de forma inmediata.

Actualmente existe un estudio fase II (PRODIGE 41-BEVANEC), diseñado para evaluar la eficacia del bevacizumab en combinación con FOLFIRI vs FOLFIRI como monoterapia, tras la progresión a la primera línea de tratamiento en CNE-GEP. Este estudio se encuentra en fase de reclutamiento por el momento y tendremos que esperar para conocer los resultados.

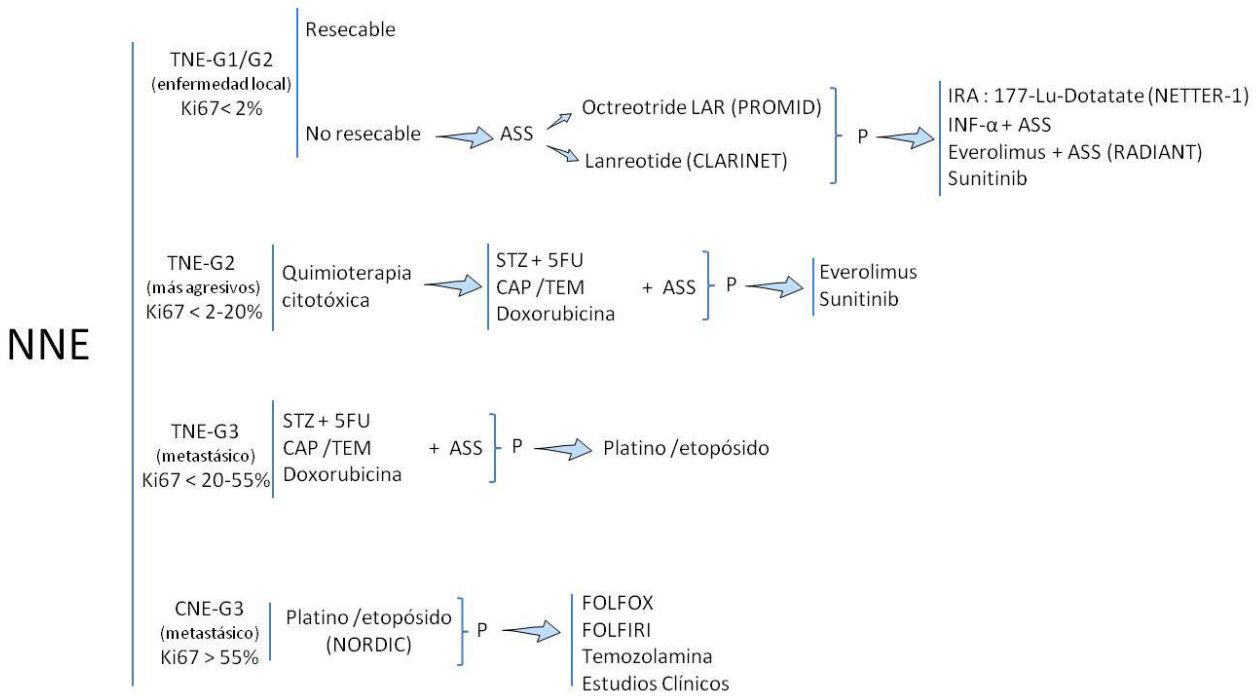


Figura 2: Algoritmo terapéutico para el abordaje de las NNEs con enfermedad local, avanzada y/o metastásica. Los estudio clínico asociados a cada tratamiento se referencian entre paréntesis. Adaptado de Pavel.M, O'Toole D, Costa F, Capdevila J, Gross D, Kianmanesh R, *et al.* ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site. *Neuroendocrinology.* 2016;103(2):172-85.

1.4 Angiogénesis y neoplasias neuroendocrinas

El proceso angiogénico se define como un mecanismo biológico caracterizado por la formación de nuevos vasos sanguíneos, necesarios para el aporte de oxígeno, glucosa y otros nutrientes a todas las células. Juega un papel muy importante en procesos patológicos, donde el balance de factores proangiogénicos y antiangiogénicos se ve alterado (25). Como parte del desarrollo tumoral se produce la neovascularización, generada por la liberación de citoquinas. Este proceso se caracteriza por el desarrollo de nuevos vasos con características estructurales concretas, sus paredes son irregulares y finas, lo que facilita la extravasación de las células tumorales al torrente sanguíneo favoreciendo su diseminación y el desarrollo de metástasis (Figura 3).

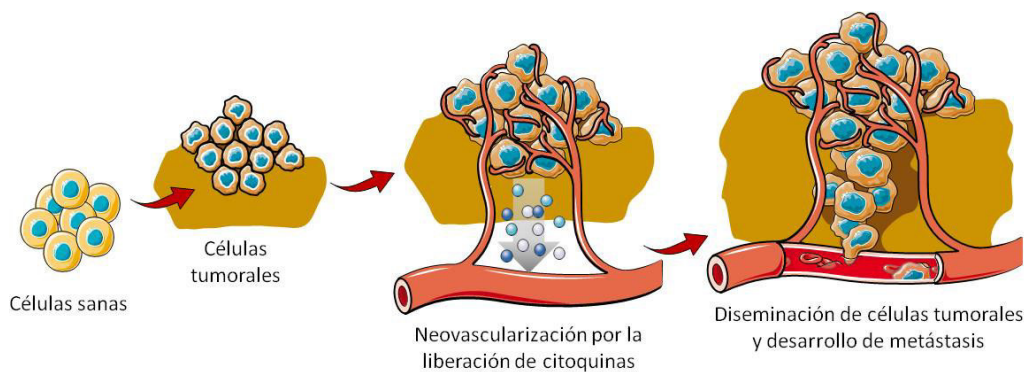


Figura 3. Neovascularización mediada por un proceso tumoral. A medida que los nuevos vasos aportan nutrientes y factores de crecimiento el volumen tumoral aumenta, pasando de una acumulación de células neoplásicas pequeñas a una masa tumoral con crecimiento maligno y con capacidad de diseminarse a otros órganos.

En la angiogénesis intervienen varios factores, los reguladores más importantes pertenecen a la familia de factores de crecimiento vascular (VEGF, por Vascular Endothelial Growth Factor, en inglés). Esta familia está formada por cinco glicoproteínas, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PGF, también conocido como PlGF), diferenciados en su patrón de expresión, sus funciones biológicas y en la unión específica a sus receptores (26). Estos ligandos interactúan con los receptores tirosina cinasa VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 y regulan su señalización río abajo. Estas interacciones también pueden estar reguladas por co-receptores no enzimáticos como la Neuropilina-1 (Nrp-1) (27) (Figura 4).

En el desarrollo tumoral, los factores VEGF son secretados tanto por las células tumorales como por las células estromales (endoteliales, macrófagos y fibroblastos) regulando múltiples funciones en el microambiente tumoral. Su función principal es el desarrollo de los nuevos vasos sanguíneos, la unión de estos ligandos a sus receptores inducen la proliferación y migración de las células endoteliales y una degradación y remodelación de la matriz extracelular. El VEGF-A regula la angiogénesis y la permeabilidad vascular mediante la activación de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, teniendo más afinidad por este último. Los ligandos VEGF-B y PlGF activan la angiogénesis vía VEGFR-1; el receptor 3 es activado por VEGF-C y D y regula sobre todo la linfangiogénesis. El resto de factores proangiogénicos, como pueden ser el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por Platelet Derived Growth Factor, en inglés) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), estabilizan los nuevos vasos y regulan la proliferación y diferenciación. La familia de las angiopoyetinas (Ang-1 y Ang-2) también está implicada en la formación de la vasculatura, su receptor es Tie-2, en este caso la Ang-1 está involucrada en la migración de las células endoteliales, mientras que Ang-2 es un desestabilizador de los vasos (Figura 4).

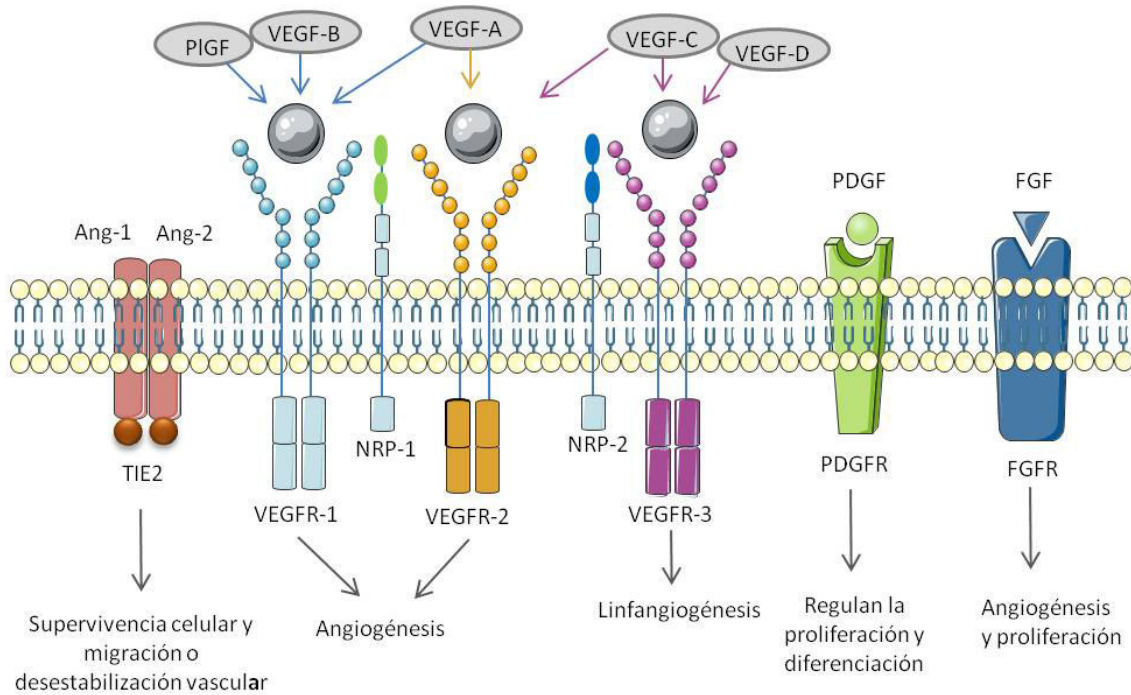


Figura 4. Vías de señalización mediada por la familia del factor de crecimiento vascular (VEGF), PDGF, FGF y angiopoyetinas. La unión de los ligandos a sus receptores induce la activación de todos los procesos relacionados con angiogénesis.

Las NNEs son tumores muy vascularizados con una alta expresión de moléculas proangiogénicas, como la familia VEGF, dando lugar a una vasculatura muy caótica y con una arquitectura inestable. En lo que respecta a los CNEs son tumores menos vascularizados que los TNEs, pero sus vasos poseen una alta actividad proliferativa y muestran una mayor actividad angiogénica en las células endoteliales (25). Como consecuencia la angiogénesis es mucho más pronunciada en los CNEs que en los TNEs (28). La alta expresión de factores angiogénicos, sobre todo de los miembros de la familia VEGF, los hace potenciales candidatos de una terapia alternativa basada en el bloqueo de estos ligandos.

El beneficio terapéutico de diferentes moléculas antiangiogénicas ha sido testado para los TNE bien diferenciados, tanto en estudios preclínicos como en estudios clínicos. Uno de los agentes más utilizados es bevacizumab, se trata de un anticuerpo monoclonal dirigido específicamente contra VEGF-A y cuyos primeros ensayos clínicos mostraron resultados alentadores en tumores carcinoides (29–32); sin embargo estudios aleatorios posteriores, en fase II y III, no mostraron un efecto antitumoral suficientemente relevante en estos tumores (14,33). Aflibercept (VEGF-trap, también conocido como ziv-aflibercept) es una proteína de fusión recombinante que combina en su estructura la fracción constante de cualquier IgG con una fracción variable construida con los dominios extracelulares de VEGFR-1 y VEGFR-2. Esta proteína es capaz de neutralizar a los ligandos VEGF-A, VEGF-B y PIGF con gran afinidad, al contrario que bevacizumab que únicamente es capaz de

unirse al VEGF-A (34). En este caso, los ensayos preclínicos realizados han demostrado la eficacia del aflibercept en la supresión del crecimiento tumoral y la angiogénesis en varios tipos de tumores (35–39), pero por el momento no se ha evaluado su beneficio en NNEs. Dentro de los tratamientos antiangiogénicos también se encuentran otros anticuerpos monoclonales como ramucirumab e inhibidores de cinasas, como pueden ser sunitinib, sorafenib, regorafenib, pazopanib, etc... todos ellos actúan inhibiendo la angiogénesis mediante el bloqueo de los receptores de VEGF. Algunos de estos inhibidores han sido evaluados en TNEs observando un ligero beneficio clínico (40–43) (Figura 5).

Si nos centramos en las NNEs G3, sunitinib se ha evaluado en NNE-GEP-G3. Este estudio concluye que este grupo de tumores tienen una peor SLP y SG con respecto a las NNE bien diferenciadas, y que dentro de los G3, responden mejor aquellos que presentan un ki67 menor del 50% (44). Respecto a otros anticuerpos monoclonales dirigidos directamente contra los receptores de VEGF, en este último año se ha publicado un estudio retrospectivo en que se analiza la eficacia del Ramucirumab combinado con quimioterapia en CNE-gástrico, con una mejora significativa en SLP y SG aunque el número de pacientes incluidos en este estudio fue muy reducido (45). Como hemos comentado anteriormente, bevacizumab es el único antiangiogénico dirigido contra los ligandos VEGF que actualmente está siendo valorado en un estudio fase II (PRODIGE 41-BEVANEC) en CNE-GEP.

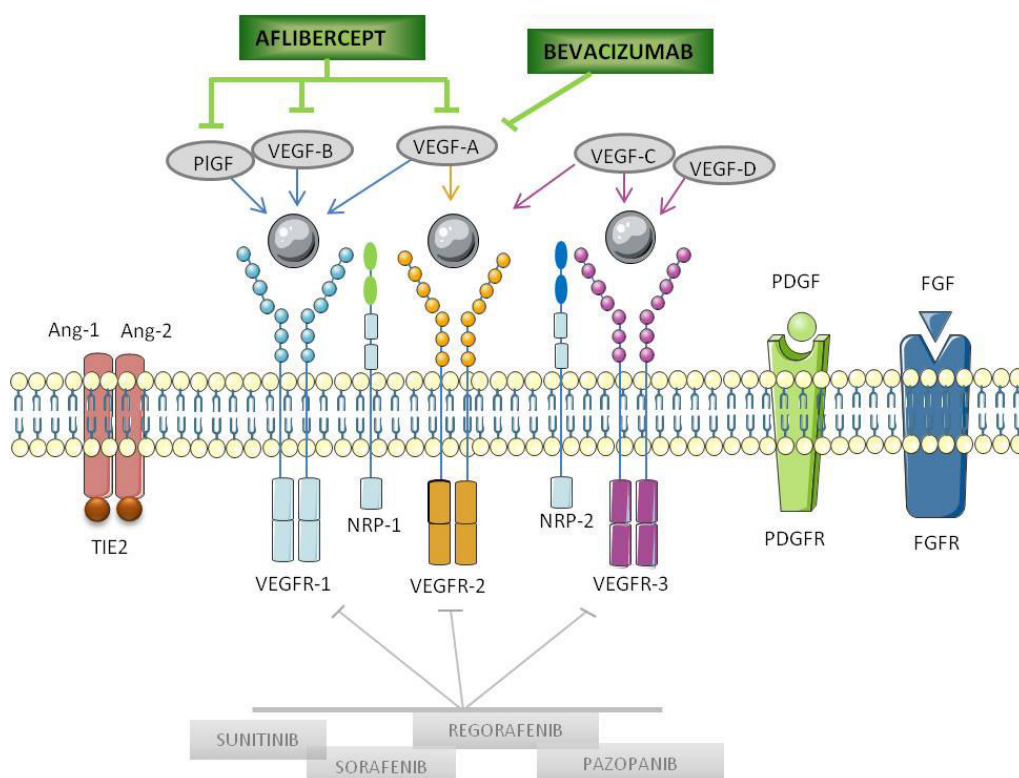


Figura 5. Fármacos que bloquean la vía angiogénica. Aflibercept dirigido contra PIGF, VEGF-B y VEGF-A y bevacizumab neutraliza VEGF-A. Sunitinib, sorafenib, regorafenib, pazopanib, son inhibidores que actúan a nivel de los receptores VEGFR 1-3.

1.5 Biología molecular de los CNE

Existen pocos datos sobre marcadores genéticos tanto de pronóstico como predictivos que permitan discernir que tratamiento sería más beneficioso para pacientes con CNE (46,47). Por el momento, se conoce que alteraciones en genes como *KRAS*, *ASCL1*, *TP53* y *RB1* podrían ser marcadores de NNE pobremente diferenciadas, y que ayudarían a diferenciar un CNE de un TNE-G3 (48). Mutaciones en *RB1* se correlacionan con la falta de expresión de la proteína Rb, esta pérdida podría predecir la respuesta a quimioterapia basada en platino en pacientes con CNE de páncreas (49). Por otro lado existen evidencias del papel de Notch-1 en la supresión tumoral en CNE. Además, una característica propia de estos CNE es tener *TP53* mutado o una expresión aberrante de su proteína, p53 (46). La expresión de p53 ya había sido descrita como un biomarcador subrogado para los CNE (50,51), pero esta expresión no es 100% específica ya que hay CNE que no muestran una expresión aberrante de esta proteína. La expresión de la proteína PD-L1 en células tumorales es considerado un biomarcador predictor de respuesta a inmunoterapia en diferentes neoplasias. En TNE la expresión de PD-L1 está significativamente asociada a los TNE-G3 (52) lo que sugiere que estos tumores podrían beneficiarse de este tipo de terapias. Se sabe que en el caso de pulmón, los CNEG por su cercanía a los CPCP son en su mayoría negativos para la proteína RB, suelen presentar positividad para p53 y BCL-2, y presentan una sobreexpresión de c-Kit en el 55% de los casos (53). Sin embargo, ninguno de estos marcadores se ha evaluado como marcador predictor de las terapias actualmente utilizadas. La identificación de nuevos biomarcadores podría favorecer el desarrollo de tratamiento personalizados en pacientes con NNE y más concretamente con CNE.

En resumen, existen diferentes alternativas terapéuticas después de la progresión a primera línea en los pacientes con TNEs y el manejo de estos pacientes está más definido. Sin embargo, en el caso de los pacientes con CNE existen muchas lagunas en lo relacionado con su manejo, especialmente en cuanto a su tratamiento se refiere. El hecho de que estos tumores presenten una actividad angiogénica tan elevada, los convierte en una diana muy atractiva para el estudio de nuevas terapias basadas en fármacos antiangiogénicos. En este trabajo valoramos el efecto de aflibercept y bevacizumab en dos modelos preclínicos en ratones mediante el desarrollo de tumores por xenoinjerto a partir de células tumorales de origen gastrointestinal o pulmonar con características de CNE. Además de evaluar su actividad antitumoral, analizamos un posible mecanismo asociado a la acción de estos fármacos y realizamos un perfil de expresión génica con el fin de identificar nuevas rutas moduladas por estos antiangiogénicos que nos revelen nuevos marcadores predictivos así como nuevas potenciales dianas.

OBJETIVOS

Los carcinomas neuroendocrinos son tumores con una elevada actividad angiogénica por lo que las terapias anti-VEGF podrían ser una alternativa terapéutica para este grupo de neoplasias.

Para confirmar o rechazar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos para la presente Tesis Doctoral:

1. Desarrollar modelos de xenoinjerto murinos con líneas celulares humanas de carcinoma neuroendocrino de origen gastrointestinal o pulmonar
2. Evaluar la actividad antitumoral de los fármacos anti-VEGF, aflibercept y bevacizumab, en dichos modelos
3. Caracterizar y validar el mecanismo molecular de acción de dichos fármacos
4. Identificar nuevas rutas moduladas por aflibercept o bevacizumab mediante un panel de expresión génica

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

Las dos líneas celulares derivadas de tumores humanos utilizadas para el desarrollo de este trabajo fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Milan, Italia). H460 (ATCC® HTB-177), carcinoma neuroendocrino de célula grande de pulmón. COLO320 (ATCC® CCL-220), aunque la ATCC la describe como un adenocarcinoma mixto de colon, en diciembre de 1979, Quinn LA *et al.* ya la describieron como un carcinoma neuroendocrino (54). El crecimiento de ambas células se llevó a cabo en frascos de cultivo de 175cm², con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 5% de penicilina (100U/ml)-estreptomicina (100 µg/ml). Su mantenimiento se realizó en un incubador humidificado a 37°C y 5% de CO₂.

La amplificación del cultivo se realizó en una cabina de flujo laminar tipo II. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se aspiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con una solución de tampón fosfato (STF), y se cubrió la superficie del cultivo con una solución de tripsina/EDTA al 4% durante 3 minutos con el fin de disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y en suspensión. Posteriormente, se añadió medio suplementado para inactivar la reacción y centrifugamos 5 minutos a 1200rpm. El *pellet* o precipitado celular que obtenemos se resuspende en RPMI 1640 suplementado y se siembra en un nuevo frasco.

Para determinar la viabilidad celular utilizamos un ensayo de exclusión del colorante vital azul tripán (Bio-Rad) y la cámara de Neubauer para el conteo celular. El azul tripán es un colorante capaz de teñir de color azul únicamente las células muertas o aquellas en las que la membrana este fragmentada, lo que nos permite cuantificar las células vivas que son aquellas que mantiene su color original translucido o blanco. La cámara de Neubauer es un sistema de conteo adaptado al microscopio óptico. Consiste en un portaobjetos con una hendidura central en la que se encuentra marcada una cuadrícula de 3x3 mm², dividida en cuatro cuadrantes. El volumen comprendido entre la superficie y el cubreobjetos es de 0,1 mm³, es decir 0,1 µl. Dentro de cada cuadrícula existe un área de conteo de 1 mm², esto nos permite hacer un cálculo del número de células existentes en un volumen fijo.

De la suspensión celular que tenemos, tomamos 50 µl y lo mezclamos en un tubo de 1,5 ml con otros 50µl de azul tripán al 0,4%. A continuación se pipetea 10 µl de la mezcla y se colocan en la cámara de Neubauer procediendo al recuento del número de células vivas, en al menos dos de los cuatro cuadrantes, utilizando un microscopio óptico (MC17OHD, Leica, Barcelona). Para calcular el número de células por mililitro que tenemos utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = (\text{n}^\circ \text{ de células vivas} \times 10.000) / \text{n}^\circ \text{ de cuadrantes}$$

3.2 Modelo animal

Para obtener las muestras necesarias para desarrollar este trabajo realizamos dos modelos de xenoinjerto en ratón utilizando las dos líneas celulares de carcinoma neuroendocrino ya mencionadas, H460 y COLO320.

Para llevar a cabo estos modelos animales utilizamos un total de 36 ratones hembra atómicos de 8 semanas de edad, cepa Foxn1nu, proporcionados por los laboratorios Harlan (Envigo CRS, S.A., Barcelona). El cuidado y mantenimiento de los ratones se realizó de acuerdo a las condiciones establecidos para el bienestar animal en animales inmunodeprimidos: acceso libre a agua-clorada, comida irradiada, ciclos de luz-oscuridad constantes (12h de luz/12h de oscuridad), temperatura de 25-28°C y una humedad del 45-65%.

A 18 de los 36 ratones les fueron inyectadas, por vía subcutánea en ambos flancos, 2×10^6 células tumorales H460 diluidas en PBS y mezcladas con Matrigel en una proporción 1:1. Los otros 18 ratones recibieron 2×10^6 células tumorales COLO320, inyectados por vía subcutánea en condiciones similares. Cuando el volumen tumoral alcanzó aproximadamente 150 mm^3 , separamos al azar los ratones en 3 grupos de estudio por línea celular (control n=6; aflibercept n=6; bevacizumab n=6) y se comenzó el tratamiento cada 3 días durante 21 días. A lo largo de estas tres semanas realizamos un control del peso y del tamaño tumoral 3 veces por semana. La dosis de tratamiento suministrado se realizó de acuerdo a trabajos previamente publicados (55,56):

- Aflibercept: por vía subcutánea a una concentración de 25mg/kg
- Bevacizumab: por vía intraperitoneal a una concentración de 5mg/kg
- Suero salino (vehículo): por ambas vías de administración a un volumen final igual que los dos tratamientos suministrados.

Los ratones fueron sacrificados por inhalación con CO_2 y posteriormente se extrajeron los tumores desarrollados.

Todos los procedimientos realizados y los protocolos experimentales fueron aprobados tanto por el Comité de Ética Animal del Instituto de Investigación Sanitaria- Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España), como por la Dirección General de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (nº: PROEXP 024/15), cumpliendo con los requisitos establecidos por el Gobierno Español y la Comunidad Europea (RD 53/2013).

3.2.1 Medidas para evaluar la actividad antitumoral

Para evaluar la actividad antitumoral de los tratamientos, calculamos el volumen tumoral aplicando la ecuación $(a \times b^2)/2$, donde “a” representa el diámetro largo del tumor y “b” representa el diámetro perpendicular. En las curvas de crecimiento representamos los valores medios del volumen tumoral para cada grupo de estudio (control, aflibercept y bevacizumab) durante los 21 días de tratamiento.

La actividad antitumoral también fue evaluada en dos etapas diferentes, etapa temprana (primera semana de tratamiento) y etapa tardía (última semana de tratamiento). Para ello se calculó el ratio del volumen tumoral dividiendo la media del volumen tumoral a día 7 (fase temprana) o día 14 (fase tardía) entre la media del volumen tumoral para el día 1 o día 21, respectivamente.

3.2.2 Medidas para evaluar la estabilización tumoral

De forma complementaria analizamos si los fármacos inducían una parada completa del crecimiento. En este caso se calcularon los cambios en el volumen tumoral para cada animal de forma individual dentro de cada grupo de tratamiento (ΔT = volumen a día 21 menos volumen a día 1) y para el grupo control (ΔC). Como no disponemos de un ratón control para cada uno de los ratones tratados, calculamos una media de los volúmenes tumores del grupo control para cada línea (media ΔC). Para cada tumor tratado se calculó y representó el ratio $\Delta T / \text{media } \Delta C$. Los valores $\leq 0\%$ nos indicaron una parada completa del crecimiento tumoral.

3.2.3 Tumor Control Index

En 2017, Corwin WL et al. de la universidad de Connecticut, publican un artículo en el que demuestran la eficacia de una nueva herramienta informática, “SL Tumor Control Index Macro” (SL TCI Macro), capaz de evaluar la cinética de crecimiento tumoral en modelos animales experimentales ofreciéndonos una alternativa a los parámetros previamente calculados.

Partiendo de los datos brutos de crecimiento tumoral (volúmenes), indicando el tiempo de medición y el umbral de fluctuación, esta herramienta nos permite calcular un valor TCI que tiene en cuenta tres parámetros o valores diferentes: la inhibición tumoral, representada por los cambios observados en el crecimiento tumoral en el grupo tratado con respecto al control; la estabilización tumoral, que indica el periodo o duración del crecimiento tumoral en el cual no se han producido cambios; y la reversión del crecimiento tumoral.

Todos los valores están relativizados con respecto al grupo control. Para calcular la inhibición tumoral, se utilizaron las diferencias existentes en el volumen tumoral para cada uno de los ratones en una ventana temporal del día 1 al día 21. Los cambios producidos se consideraron teniendo en cuenta que el control presenta un 100% de progresión. El valor de estabilidad se calculó, para cada

1020). Este procedimiento consta de tres pasos: deshidratación, inmersión de las muestras en concentraciones crecientes de etanol desde 70% al 100%; preimpregnación, inmersión de la muestra en xileno; y por último infiltración, inmersión en parafina líquida. Para la generación de cada bloque vertimos un poco de parafina líquida sobre un molde metálico, colocamos la pieza, la orientamos y por último colocamos la base del casete de inclusión. Con cuidado se desplaza el molde sobre una base fría para conseguir la solidificación rápida de la parafina y evitar así la formación de cristales. Una vez solidificado se extrae el molde y obtenemos el bloque final.

Con todos los bloques generados desarrollamos un microarray de tejido (TMA, Tissue Microarray en inglés). La realización del TMA nos permite, de una forma rápida y eficaz, valorar de forma simultánea un gran número de muestras en las mismas condiciones. En el primer modelo de xenoinjerto, desarrollado a partir de la línea celular H460, obtuvimos un total de 37 tumores, con el que generamos un TMA formado por 111 cilindros (3 cilindros representativos de cada bloque). Con los 28 tumores generados en el modelo de xenoinjerto de COLO320 realizamos un TMA con 84 cilindros representativos.

Para seleccionar los cilindros representativos que formarán parte del TMA se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en una laminilla de 2.5µm de cada uno de los bloques. El patólogo revisó todos los casos y marcó la zona de interés. Mediante un arrayer o estación de trabajo para TMA (MTA-1, Beecher Instruments, Sun Prairie, USA), se tomaron cilindros de 0,6 mm de diámetro, que se insertaron en un nuevo bloque "receptor" de parafina (Figura 6B). Se realizaron cortes seriados de 4µm de espesor de cada TMA con el micrótopo (Leica-Biosystems) y posteriormente se colocaron en portaobjetos específicos para realizar inmunotinciones (Dako).

3.5 Inmunodetecciones

3.5.1 Inmunohistoquímica

Todas las inmunohistoquímicas realizadas en este trabajo comenzaron con una recuperación antigénica llevada a cabo de forma automática en el PT-Link (Dako, Glostrup, Denmark) durante 20 min a 95°C en presencia de un tampón de Tris/EDTA a pH6 (EnVision Dako Kit). Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena añadiendo sobre el tejido un tampón de fosfato que contiene peróxido de hidrógeno al 0,03% durante 5 min. A continuación se realizó un lavado de 5 min con una solución salina tamponada con Tris y 0,1% de Tween-20 a un pH7,6, y se incubó el anticuerpo primario correspondiente durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación se continuó con la incubación del anticuerpo secundario (EnVision™ FLEX /HRP, Dako kit), un polímero conjugado con peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra contra inmunoglobulinas de conejo y

ratón. Para visualizar estas secciones se incubó de 7-10 min con el cromógeno tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina y se contratiñó con hematoxilina.

Las proteínas analizadas mediante esta técnica fueron: Ki67 (GA626, Dako), Cromogranina A (Cg A) (M0869, Dako), Sinaftofisina (IR660, Dako), p53 (GA616, Dako), Galectina-1 (ab138513, 1/1000; abcam), alpha-SMA (Dako Omnis) y Vimentina (GA630, Dako).

Para valorar la inmunoreactividad que observamos con cada una de las tinciones, calculamos un valor semicuantitativo (HScore), en el que tenemos en cuenta tanto el porcentaje de células positivamente teñidas (PC= 0-100%) como la intensidad (I) de la tinción. La intensidad se clasificó como cero (sin tinción), +1 (tinción débil), + 2 (tinción moderada) y + 3 (tinción fuerte). El valor final de HScore para cada grupo de estudio tiene un rango de 0 a 300 y se determinó tras aplicar la siguiente fórmula: $HScore = \sum (I \times PC)$, donde "I" representa la intensidad más alta y PC el porcentaje mayor de células teñidas de los tres cilindros para cada uno de los tumores analizados.

Todas las inmunohistoquímicas fueron valoradas por un patólogo experto.

3.5.2 Inmunofluorescencia

Para evaluar si los fármacos afectaban a la localización celular de proteínas específicas se utilizó la técnica de inmunofluorescencia. Para su realización se utilizaron secciones de tejido de 2,5µm de espesor de los TMAs. El grosor del corte es menor para facilitar el acceso del anticuerpo a todas las zonas del tejido.

En este caso el primer paso, previa desparafinización en estufa 1h a 65°C, es la rehidratación del tejido lavando primero con Xilol durante 15 min, posteriormente con concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 70%), y finalmente con agua destilada. Con este paso se aseguró la eliminación de restos de parafina y se evitó la autofluorescencia propia de la parafina. Para la recuperación antigénica se colocó los cristales en el PT-Link (Dako, Glostrup, Denmark) durante 20 min a 95°C en presencia de un tampón de Tris/EDTA a pH6 (EnVision Dako Kit). Posteriormente se marcó la zona del tejido con un Dako-PEN (marcador hidrofóbico) para delimitar la zona de inmunodetección y se lavó 5 min con PBS 1X. Para eliminar el exceso de autofluorescencia del tejido se añadió CLNH₄ 50mM durante 10 min. Tras un lavado de 5 min con PBS 1X, se incubó 1h con la solución de bloqueo (BSA al 4% en PBS) y se añadió el anticuerpo primario a una dilución 1:50 en PBS 1x que se mantuvo toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Al día siguiente se lavó en PBS 1x durante 5 min y se incubó el anticuerpo secundario (Alexa Fluor®488 anti-conejo IgG (H+L) o Alexa Fluor®488 anti- ratón IgG(H+L)) durante 1 h a 37°C. En oscuridad se lavó con PBS 1x y se tiñeron los núcleos con DAPI (intercalante de ADN) durante 3 min. Para la visualización de la tinción se utilizó un

medio de montaje soluble (FluorSave™ Reagent, Calbiochem) y se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad durante 24h. Los cristales se conservaron a 4°C en oscuridad. Para visualizar el marcaje y ver la localización de las proteínas utilizamos un microscopio confocal (SP5, Leica).

Las proteínas analizadas con esta técnica fueron E-Cadherina (610181, BD Transduction Laboratories™) y B-Catenina (610153, BD Transduction Laboratories™).

3.6 Western Blot

Una parte de cada tumor extraído se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para conservar sus características moleculares y su estructura original (Figura 6A). A partir de este tejido congelado y sin perder la cadena de frío, se llevó a cabo un proceso manual de pulverización para homogeneizar el tejido.

Para la extracción de proteína total se utilizó entre 20 y 30 mg de tejido pulverizado que se sometió a un proceso de digestión utilizando 400 ul de tampón de lisis RIPA (25mM Tris-base (pH 7,4), 0.15M NaCl, 5mM EDTA (pH 8), 1% NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas (25X, Roche) y de fosfatasas (PhosSTOP, 2X, Roche). Este proceso se llevó a cabo durante 20-30 min en hielo para una completa lisis del tejido y posteriormente se centrifugó a 12000rpm y 4°C durante 10 min, obteniendo un sobrenadante con la proteína total.

La concentración total de proteína se cuantificó mediante un método colorimétrico, kit comercial (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher-Scientific™), en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 562nm. Este método nos permitió medir de forma precisa la concentración total de proteína comparándola con una proteína estándar (albúmina sérica bovina (ASB)).

Para evaluar los niveles de cada una de las proteínas de nuestro estudio, se desnaturalizaron las muestras mezclando 20ug de cada una de ellas con un tampón de carga al 2X (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad) y 5% de beta-mercaptoetanol, e incubando 5 min a 95%. Las muestras (20ug de proteína por carril) fueron separadas por peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, en inglés) al 10%, se genera un entramado en el que el tamaño del poro es inversamente proporcional a su concentración. La electroforesis la realizamos a un voltaje de 120V durante aproximadamente 1h y 30 min, dependiendo del tamaño de la proteína de interés.

Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa a 0,3A durante 2h a 4°C. Se lavó la membrana con una solución tamponada de Tris buffer salino - Tween-20 (TTBS; Tris 25mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH 7,4), y se bloqueó durante 1h a temperatura ambiente

en agitación, en una solución de leche descremada en polvo o ASB al 5% en TTBS. Se repitieron los lavados, 3 lavados de 10 min con TTBS, y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C en agitación. Cada uno de los anticuerpos se diluyó en 5% de leche/TTBS o ASB/TTBS dependiendo de sus características (Tabla 3). Se eliminó el exceso del anticuerpo lavando con TTBS y se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario, anti-ratón o anti-conejo según corresponda, conjugado con peroxidasa y previamente diluido. Finalmente se lavó y se reveló. El revelado de la membrana se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL prime (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) y el fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

Tabla 3. Características de los anticuerpos utilizados para Western-Blot

Anticuerpos	Dilución Ac Primario	Medio de dilución	Especie	Dilución Ac Secundario	Casa comercial
VEGF-B	1:200	Leche	Conejo	1:5000	Abcam
PIGF	1:1000	ASB	Conejo	1:5000	Abcam
GAL-1	1:200	ASB	Conejo	1:5000	Abcam
MMP2	1:1000	Leche	Ratón	1:10000	Cell Signalling
p-VEGFR2 (Y1214)	1:200	ASB	Ratón	1:5000	Abcam
ACTINA	1:3000	Leche	Conejo	1:10000	Cell Signalling
GAPDH	1:4000	Leche	Ratón	1:10000	Cell Signalling

3.7 Enzimoinmunoensayo (ELISA: Enzyme-Linked Inmonosorbent Assay en ingles)

Para cuantificar la concentración de proteína VEGF-A se utilizó un Kit de ELISA comercial (ELISA Kit for Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA), Cloud-Clone Copr, Katy TX, USA).

Se partió de una placa previamente tratada en la que se encuentra unido el anticuerpo- anti VEGF-A, directamente sobre este anticuerpo, en cada pocillo, se añadió la cada una de las muestras (antígeno) a una concentración conocida, y se incubó 1h a 37°C, permitiendo que se de la unión antígeno- anticuerpo. Cada muestra se analizó por triplicado. Posteriormente se vació la placa y se añadió en cada pocillo 100 µl de reactivo A, tras 1h de incubación a 37°C y cinco lavados posteriores (solución de lavado proporcionada por el Kit), se añadió el reactivo B que en este caso solo se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Estos dos reactivos corresponden a anticuerpos anti-VEGF-A marcados. Por lo tanto cada molécula de antígeno (nuestra proteína) estará unida a un anticuerpo por la base y un segundo anticuerpo (en este caso 2) que lo marca, el conocido efecto “sándwich”. Para detectar esta interacción, se añadió 90µl de la solución de sustrato a cada unos de los pocillos, se incubó entre 10 y 20 min a 37°C en oscuridad y se añadió la solución de parada (STOP solution). Al

añadir el sustrato tiene lugar una reacción colorimétrica (color azul), producida por la enzima conjugada al anticuerpo, al degradar el sustrato. Al añadir la solución de STOP se vuelve a generar un cambio de color (color amarillo) que ya podemos medir en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

En paralelo al análisis de nuestras muestras, se realizó una curva estándar utilizando concentraciones conocidas de VEGFA (proporcionada por el kit) siguiendo el mismo protocolo, lo que nos permitió extrapolar la absorbancia detectada y poder calcular la concentración final de VEGF-A que teníamos en cada una de las muestras a estudio.

3.8 Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en Tiempo Real

Al igual que para la obtención de proteína, una porción de cada tumor extraído se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Para la extracción del ARN se realizó de nuevo una pulverización manual para obtener un homogeneizado del tejido.

Para llevar a cabo la extracción se utilizó 30mg de tejido homogeneizado y el kit RNeasy mini-Kit de Qiagen, siguiendo las indicaciones establecidas en el protocolo del fabricante. La concentración final del ARN lo cuantificamos con el QUBIT (Qubit RNA BR Assay Kit).

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa mediante la transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction), se partió de 200ng de ARN y se utilizó el Kit comercial High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™). De esta manera se obtuvo ADN complementario amplificado mediante una PCR tradicional. Las condiciones de la reacción fueron 10 min a 25°C, 120 min a 37°C y 4°C de forma indefinida, este proceso se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Thermofisher, España).

Para cuantificar la expresión de los genes de interés, se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real, empleando sondas TaqMan específicas para cada gen. Estas sondas están marcadas con un fluorocromo de tal forma que al ser desplazada la sonda por la acción de la polimerasa somos capaces de detectar la emisión de la fluorescencia. Se utilizaron sondas marcadas con dos fluorocromos distintos;

- FAM, para las sondas específicas de los genes de interés: COL3A1 (Hs 0943809_m1), COL5A1 (Hs 00609133_m1), LGALS1 (Hs 0035202_m1) y Lgals1 (Mn 00839408_g1)

- VIC, para las sondas de los genes de referencia o controles endógenos: RPLP0 (Hs 99999902_m1) codifica para la proteína ribosomal larga o 60s y Gapdh (Mm 99999915_g1), codifica para la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Utilizar dos fluorocromos diferentes nos permite optimizar la reacción, de forma que podemos mezclar ambas sondas en un mismo tubo (PCR multiplex) ya que cada una se unirá a una diana o a un gen endógeno específico. Cada una de las muestras fue analizada por triplicado y la plataforma que se utilizó fue la 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR es proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. Para calcular la diferencia de expresión de cada gen con respecto a su control endógeno calculamos el delta Ct [$\Delta Ct = Ct(\text{gen diana}) - Ct(\text{gen de referencia})$], el valor Ct corresponde al punto en el cual comienza la reacción de amplificación. Con este valor ΔCt , calculamos la expresión relativa de cada uno de los genes comparando la media de expresión de cada grupo de estudio (ΔCt_{media}) con respecto a la media del grupo control, este valor es el delta delta Ct [$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{grupo tratado}) - \Delta Ct(\text{grupo control})$]. Este método es conocido como el doble incremento de ciclo y su representación gráfica sigue la siguiente ecuación; $RQ = 2^{-\Delta \Delta Ct}$

3.10 Generación de librerías y análisis de secuenciación

La tecnología de Next-Generation Sequencing (NGS) nos permite el análisis de múltiples genes que se secuencian simultáneamente en una única carrera, proporcionándonos información genómica a gran escala genómica en un tiempo muy corto. Para profundizar en la regulación transcripcional mediada por ambos fármacos se realizó un perfil de expresión génica mediante un panel dirigido de Illumina (TruSight RNA Pan-Cancer) de 1385 genes relacionados con el proceso de cáncer. Para ello se ha seguido el esquema de trabajo que se indica en el protocolo de Illumina y que queda resumido a continuación y en la figura 7:

Preparación de librerías: partiendo de ARN fragmentado de forma enzimática, se sintetizó ADNc, en cuyos extremos 5' y 3' se añaden unos adaptadores, de secuencia conocida con el fin de aumentar la eficiencia del proceso. Este ADN se hibridó con las sondas específicas, se amplificó, purificó y enriqueció mediante el empleo de AMPure XP Beads. De esta manera se generaron un total de 24 librerías, 4 muestras por grupo (control, aflibercept y bevacizumab) para las dos líneas de trabajo (H460 y COLO320).

Secuenciación en MiniSeq: Se secuenciaron las 24 librerías en tres carreras diferentes, una mezcla de 8 librerías en cada una. Previamente a la secuenciación, tiene lugar la generación de clusters, y tras varios ciclos de amplificación comienza la secuenciación.

En nuestro caso se llevó a cabo una secuenciación "paired-end", que nos permitió secuenciar los fragmentos amplificados por ambos extremos y así poder estimar su tamaño. La longitud de nuestros fragmentos fue de 75pb.

Al finalizar las carreras y como parte del análisis, se comprobó que los resultados cumplían los criterios de calidad: densidad (K/mm²) de la secuenciación en torno a 235 K/mm² y probabilidad de que la lectura sea correcta para cada una de las bases con una puntuación Q de 30, es decir una precisión del 99,9%. En nuestro caso todas las carreras presentaron un 96% de lecturas \geq Q30.

Análisis de datos: Con los archivos FASTQ ya generados, se analizó la calidad de la secuenciación utilizando el programa cutadapt, con el que se corrigió la secuencia hasta que alcanzó un umbral de calidad correcto. A continuación con el programa STAR se realizó el alineamiento y el mapeo de las muestras con el genoma humano de referencia. Para asegurar un buen alineamiento, se indexó el genoma de referencia (GRCh38) con nuestro panel de estudio. Los archivos SAM obtenidos del mapeo se transformaron en archivos BAM que se procesaron utilizando las herramientas “samtools” para poder visualizarlos y realizar el conteo. Para ello se utilizó el programa IGV y HTSeq para cada una de las muestras (Figura 7).

Con los archivos HTSeq se generó una matriz de conteo con la expresión de cada uno de los genes para las 24 muestras. De esta manera se pudieron realizar todas las comparaciones necesarias utilizando RStudio y una batería de paquetes informáticos adicionales. Las comparaciones estadísticas entre los diferentes grupos de estudio se realizaron utilizando Limma, un paquete de R para identificar la expresión diferencial de los genes.

El análisis de las rutas biológicas alteradas por los fármacos de nuestro estudio se realizó con Hipathia. Esta herramienta transforma los datos informativos de la expresión génica en transmisión de señal dentro de circuitos relacionados con diferentes funciones celulares activadas por el nodo final del circuito. Hipathia recupera la información de las rutas de la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), y genera una señal para cada circuito que se transmite a través de nodos, partiendo del nodo inicial y propagándose hasta que alcanza el nodo efector.

3.11 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 20.0 (IBM SPSS statistics 20, Chicago, Illinois). Para evaluar la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales se realizó un test de normalidad para cada variable de estudio y en base a su distribución, se utilizó el método ANOVA para K muestras con un ajuste de Dunnet, ya que nos interesa ver las diferencias existentes entre tratamientos y controles (Test paramétrico) o Mann-Whitney (Test no paramétrico) con comparaciones dos a dos. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

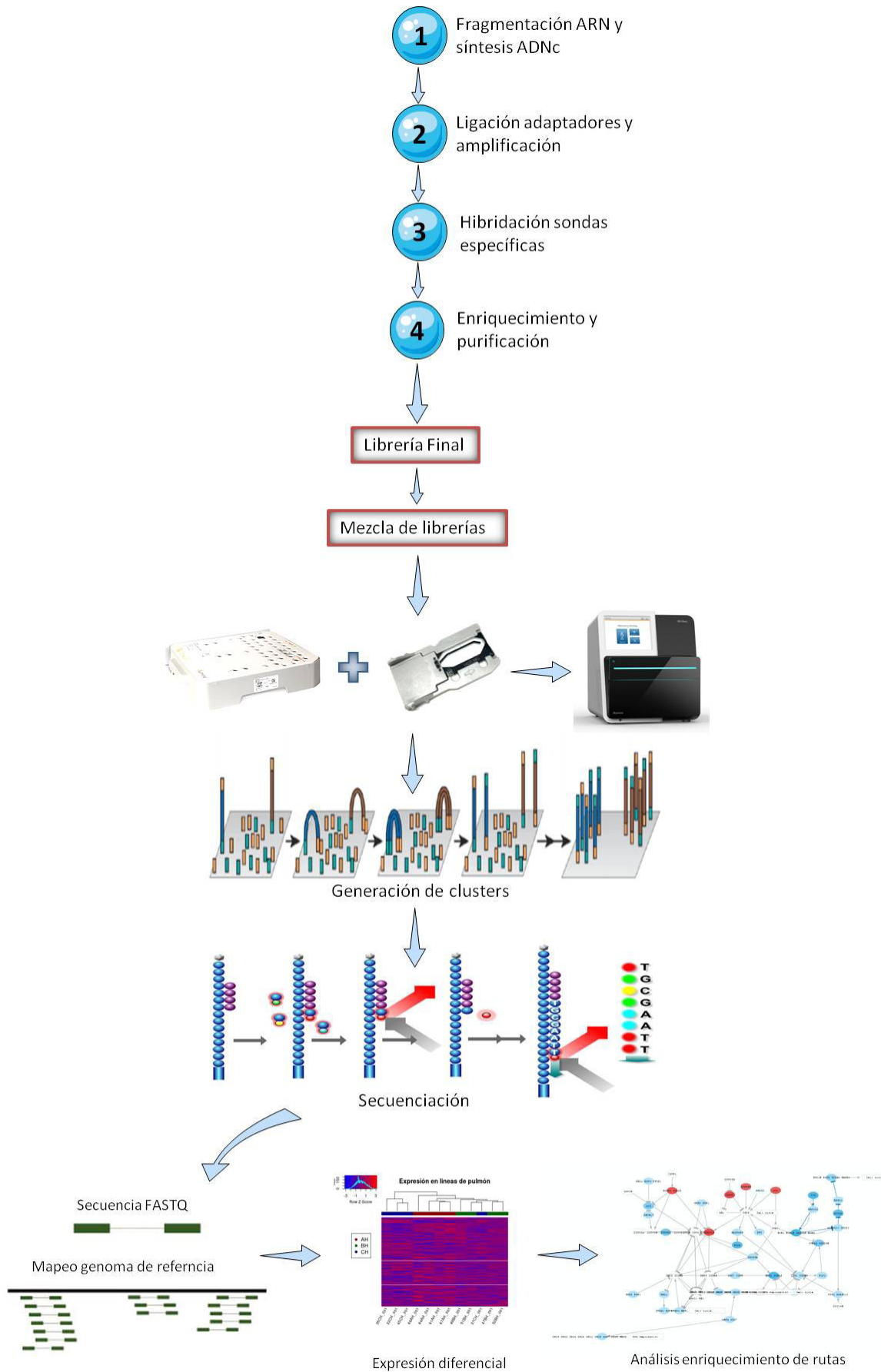


Figura 7. Proceso de secuenciación por NGS y análisis de resultados generados

RESULTADOS

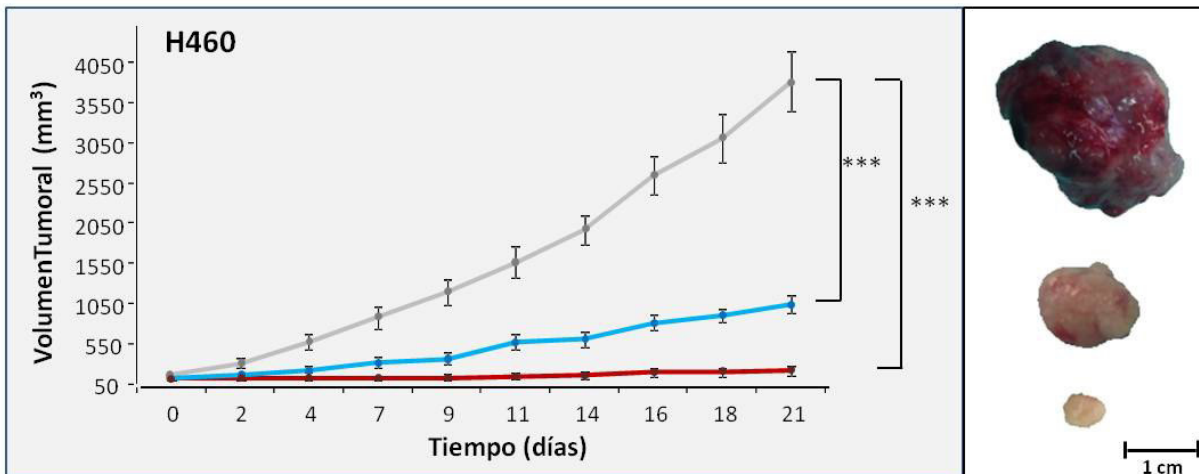
4.1 Efecto de los fármacos aflibercept y bevacizumab en el desarrollo y crecimiento tumoral in vivo de los CNEs

Los CNEs son tumores con una actividad angiogénica muy elevada. Bevacizumab y aflibercept son dos fármacos capaces de bloquear la vía angiogénica a través de su interacción con uno o varios de los miembros de la familia VEGF. Para evaluar si estos tratamientos afectan al crecimiento tumoral de los CNEs se desarrollaron dos modelos animales de xenoinjerto utilizando dos líneas de CNE humanas (H460 y COLO320).

Las curvas de crecimiento de los dos modelos nos muestran que ambos fármacos presentan una significativa actividad antitumoral (Figura 8). En el modelo H460, el volumen medio alcanzado a día 21 de tratamiento con aflibercept fue $210,75 \pm 166 \text{ mm}^3$, lo que supone un 94% de inhibición del crecimiento tumoral con respecto al grupo control ($3807,93 \pm 1371 \text{ mm}^3$; $p < 0,001$). Al tratar los tumores con bevacizumab también observamos una disminución significativa del crecimiento tumoral ($p < 0,001$), en este caso el volumen medio alcanzado fue $1039,58 \pm 414 \text{ mm}^3$, lo que supone una inhibición del 72,7% con respecto al grupo control (Figura 8A). De forma similar, evaluamos el efecto de los dos tratamientos en el modelo de COLO320 y observamos que tanto con el fármaco aflibercept como con bevacizumab se observa una inhibición significativa del crecimiento del 89,3% y 84,1%, respectivamente ($p < 0,001$). El volumen medio alcanzado para cada grupo fue $397,67 \pm 237 \text{ mm}^3$; $590,38 \pm 268 \text{ mm}^3$ y $3706,27 \pm 1918 \text{ mm}^3$ para aflibercept, bevacizumab y grupo control, respectivamente (Figura 8B).

Esta inhibición del crecimiento se confirmó macroscópicamente al extraer los tumores. En la Figura 8 se puede observar como el efecto de ambos tratamientos genera una disminución muy notable tanto en el tamaño como en la irrigación con respecto al grupo control, siendo especialmente llamativo en el caso de los tumores tratados con aflibercept.

A



B

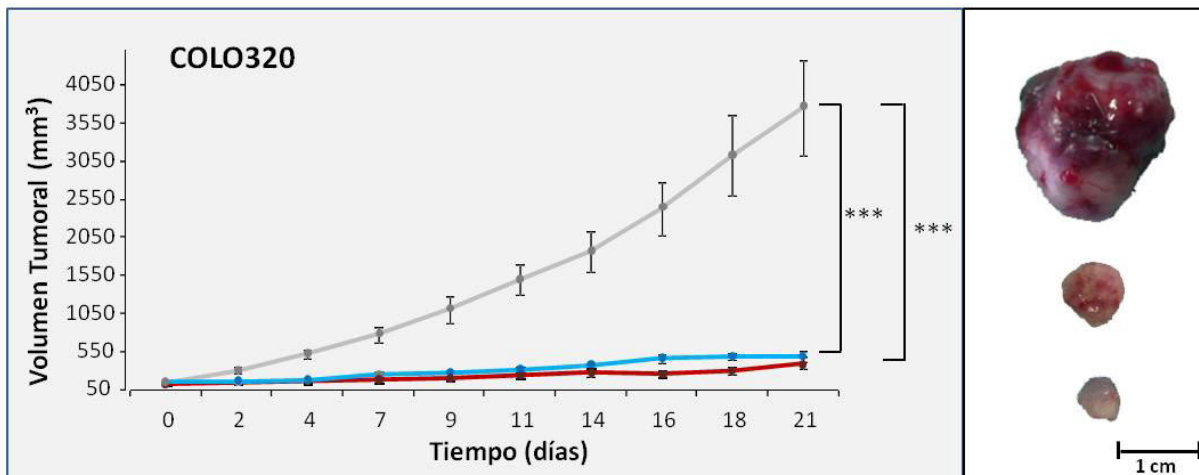


Figura 8. Inhibición del crecimiento tumoral. Efecto de aflibercept y bevacizumab en el crecimiento tumoral de los dos modelos de xenoinjerto. A) Modelo H460, B) Modelo COLO320. Los ratones fueron distribuidos al azar entre el grupo control (línea gris) y los dos tratamientos, bevacizumab (línea azul) y aflibercept (línea roja). Las medidas de los volúmenes tumorales se realizaron 3 veces por semana durante 21 días. Los paneles de la izquierda muestran las curvas de crecimiento y los paneles de la derecha las imágenes macroscópicas representativas de los tumores al final de los 21 días, de arriba-abajo: control, bevacizumab y aflibercept. Las diferencias fueron establecidas con respecto al grupo control, *** $p < 0,001$

Las curvas de crecimiento muestran que la inhibición puede estar ocurriendo desde la primera semana de tratamiento. Por tanto, nos planteamos analizar en mayor profundidad la actividad antitumoral de ambos fármacos. Para ello dividimos los datos recogidos durante los 21 días en tres fases diferentes y examinamos los cambios en el volumen tumoral en la fase temprana (día 1-7) y la fase tardía (día 14-21) (Figura 9). En ambos modelos observamos que desde el inicio del tratamiento (fase temprana) los dos fármacos muestran una significativa actividad antitumoral al compararlo con sus respectivos controles ($p < 0,001$). Esta actividad antitumoral se mantiene de forma significativa en

la etapa tardía para ambos tratamientos en los tumores derivados de la línea de colon (COLO320) y para aflibercept en los tumores generados a partir de la línea de célula grande de pulmón (CNCG) (H460). Sin embargo, bevacizumab que presenta una significativa actividad antitumoral en los primeros días de tratamiento parece no mantener ese efecto tan potente en los últimos días de tratamiento en este modelo.

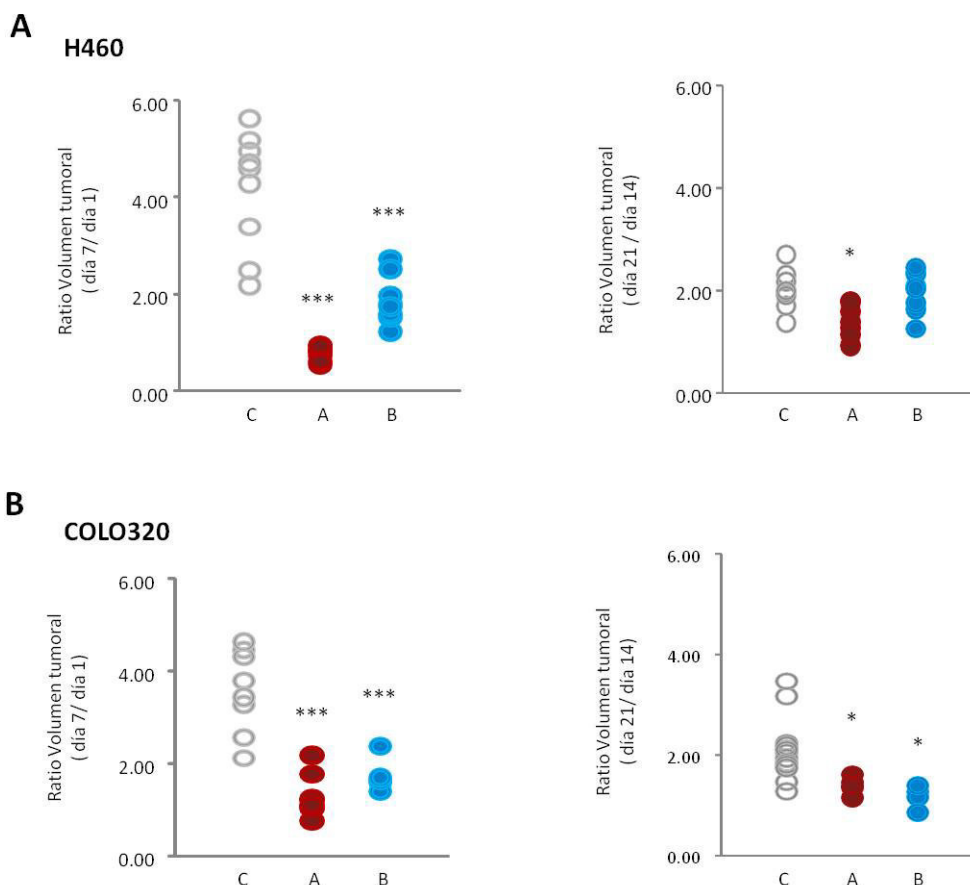


Figura 9. Análisis del efecto antitumoral de ambos fármacos en las fases inicial y tardía del tratamiento. Representación gráfica del ratio del volumen tumoral dividido en dos etapas; fase temprana (día 7/día 1) y fase tardía (día 21/ día 14). A) Modelo de xenoinjerto derivado de la línea H460, B) Modelo de xenoinjerto derivado de la línea COLO320. C, grupo control; A, tratamiento aflibercept; B, tratamiento bevacizumab. Los dos fármacos muestran una actividad antitumoral significativa desde el inicio del tratamiento (fase temprana). Las diferencias se establecieron con respecto al grupo control, *** $p < 0,001$ y * $p < 0,05$

4.2 Efecto de los fármacos aflibercept y bevacizumab en la parada o reducción del crecimiento tumoral.

Debido a la significativa inhibición del crecimiento tumoral generado por ambos tratamientos antiangiogénicos nos planteamos si esa reducción era debida a una ralentización en el crecimiento de los tumores tratados o debido a una parada total de dicho crecimiento. Para ello se calculó el ΔT (volumen final – volumen inicio tratamiento) de cada tumor y a continuación se determinó el ratio

ΔT /media ΔC (volúmenes de los tumores controles). Cuando este ratio es = 0% indica una parada del crecimiento y si es < 0% una reducción del volumen tumoral respecto al volumen antes del inicio de tratamiento. En el modelo de pulmón (H460) observamos que el ratio de los tumores tratados con aflibercept (n=9) varía en un rango entre 4,67% y -1,24% mientras que en el caso de bevacizumab (n=9) el rango es de 30,54% y 12,23% siendo estas diferencias entre ambos tratamientos estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Es importante destacar que en el caso de aflibercept el ratio ΔT /media ΔC fue $\leq 0\%$ en 6 de los 9 tumores indicando que un 66% de los tumores tratados con aflibercept pararon su crecimiento e incluso tres de ellos (TH3, 4 y 8) redujeron su tamaño (Figura 10A). En el modelo de colon (COLO320) no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos y los efectos en el crecimiento fueron similares con un ratio entre 3,26% y 10,02% para aflibercept y entre 2,65% y 16,32% para bevacizumab (Figura 10B). En este modelo ninguno de los fármacos provocó parada del crecimiento. Estos resultados nos indican que aflibercept no solo presenta una significativa actividad antitumoral sino que, en el caso de los CNCG de pulmón, también induce una parada completa en el crecimiento tumoral.

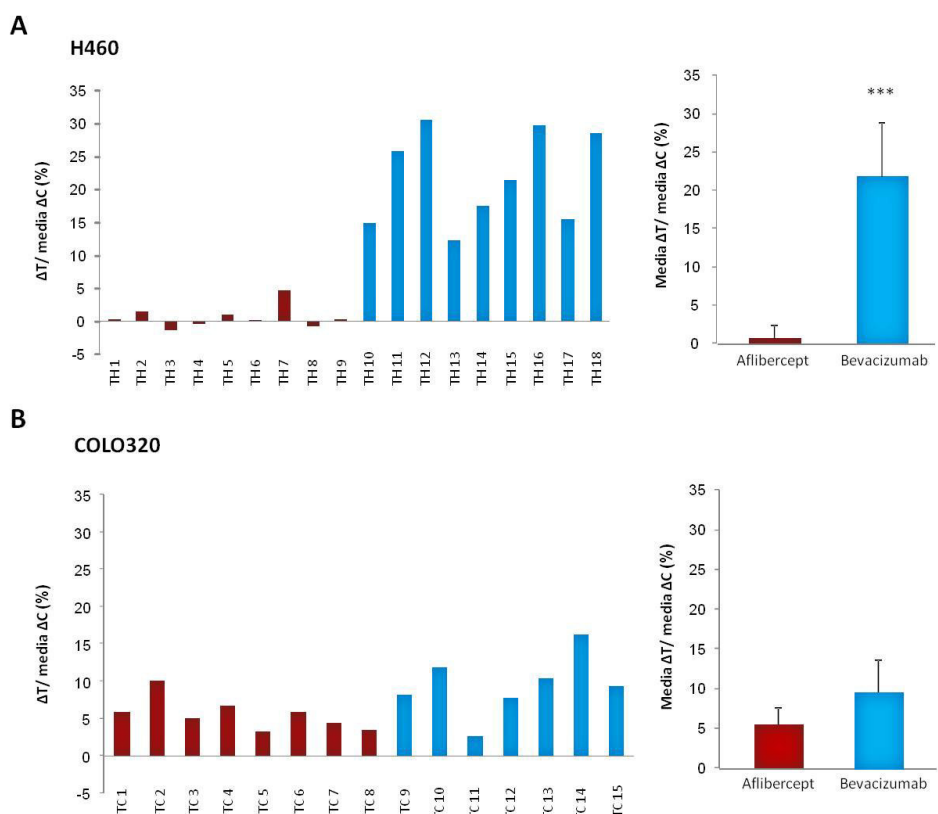


Figura 10. Análisis del efecto de aflibercept y bevacizumab sobre el crecimiento tumoral. Representación del ratio ΔT /media ΔC , para cada tumor tratado (panel izquierdo) y de la media del porcentaje de cada uno de los tratamientos (aflibercept, rojo; bevacizumab, azul) (panel derecho). A) Modelo de CNCG de pulmón (H460). B) Modelo de CNE de colon (COLO320). El tratamiento con aflibercept genera una parada del crecimiento en el 66% de los tumores. Las diferencias se establecieron entre los dos tratamientos, *** $p < 0,001$

4.3 SL Tumor Control Index Macro como método alternativo para evaluar la cinética del crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto.

Como mencionamos en la sección 2.2.3 de Materiales y Métodos se ha descrito recientemente una nueva herramienta denominada SL Tumor Control Index Macro (SL-TCI) de aplicación en modelos animales cuyos parámetros son comparables a los usados para evaluar el crecimiento tumoral en estudios clínicos humanos (57). Quisimos comparar los resultados mencionados previamente con los generados por esta herramienta. Para ello establecimos una colaboración con la Dra. Hakime Ebrahimi-Nik, de la Universidad de Connecticut.

Esta herramienta calcula un score TCI que mide el control del crecimiento tumoral. Este parámetro está compuesto por tres valores que evalúan la inhibición tumoral, reversión del crecimiento y la estabilización tumoral. El valor TCI calculado en ambos modelos murinos, H460 y COLO320, fue significativamente más alto en los grupos tratados comparados con el grupo control, es decir, el crecimiento tumoral está más controlado que en el grupo control. Cuando se compararon los TCIs de los dos grupos de tratamiento en el modelo de CNCG de pulmón observamos que aflibercept (TCI score = 12,03) presenta un control tumoral significativamente más alto que bevacizumab (TCI score = 8,38) ($p < 0,001$) (Figura 11A). Sin embargo, en el modelo de CNE de colon no observamos diferencias significativas entre el valor TCI de aflibercept (TCI score = 11,64) y bevacizumab (TCI score = 10,05) confirmando que para este modelo ambos fármacos tienen un efecto similar sobre el control tumoral (Figura 11B).

Analizamos el parámetro de estabilización tumoral (valor de estabilidad, VE) de forma individual para ver cómo se comportaban los dos fármacos en ambos modelos. Este valor se midió en función del número de días en los que el tamaño tumoral no varió en más de un 15%. En el modelo de CNCG de pulmón los tumores tratados con aflibercept mostraron un VE significativamente más alto (VE = 2,1) que los tumores control (VE = 0,31; $p < 0,05$) mientras que el grupo tratado con bevacizumab (VE = 0,9) no fue significativamente diferente al grupo control. Al comparar los VE entre los dos tratamientos se confirmó la capacidad de estabilización significativamente más alta de aflibercept ($p < 0,05$) (Figura 11C). En el modelo murino de CNE de colon, observamos diferencias significativas de VE para ambos fármacos (aflibercept VE = 2,4; $p < 0,001$ y bevacizumab VE = 1,4; $p < 0,05$) al compararlo con el grupo control (VE = 0,28) pero este valor no fue significativamente diferentes entre ambas terapias (Figura 11D).

Estos resultados indican que aflibercept tiene una gran capacidad de estabilizar el crecimiento tumoral en ambos modelos, aunque en el modelo de CNE de colon también se observa este efecto con bevacizumab.

Los resultados obtenidos con los diferentes análisis nos confirman que las terapias anti-VEGF elegidas en este trabajo inhiben de forma significativa el crecimiento tumoral y podrían abrir la puerta a nuevos esquemas de tratamiento para los carcinomas neuroendocrinos.

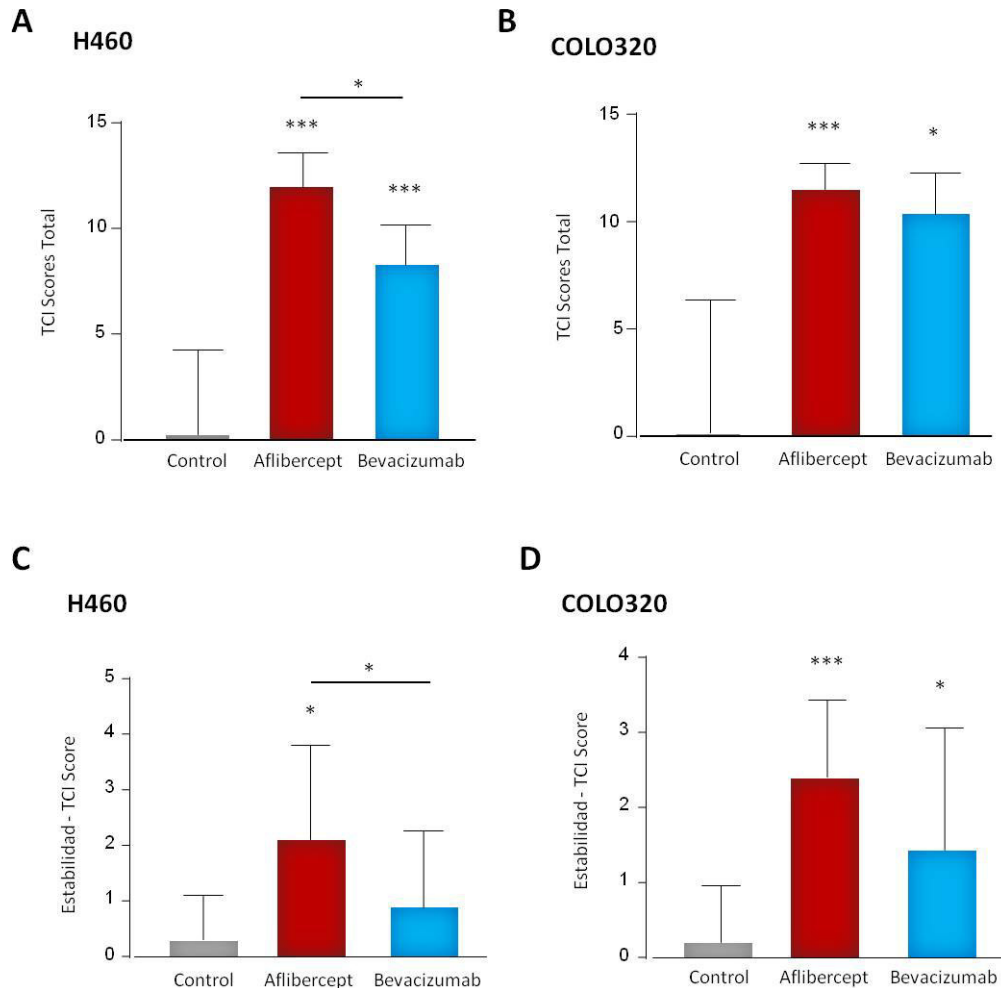


Figura 11. Análisis del control tumoral de aflibercept y bevacizumab usando la herramienta SL Tumor Control Index Macro. Los paneles superiores representan el valor TCI total para el modelo CNEG de pulmón (A) y el modelo CNE de colon (B). Los paneles inferiores muestran los valores de estabilidad como parámetro individual para el modelo de pulmón (C) y de colon (D). Estos resultados confirman que ambos fármacos controlan el crecimiento tumoral de forma significativa respecto a los controles y que aflibercept tiene una mayor capacidad de estabilizar dichos tumores en ambos modelos animales. *p<0,05; *** p<0,001

4.4 Análisis molecular de los tumores derivados de los modelos de xenoinjerto

4.4.1 Caracterización molecular

El número total de tumores incluidos en este estudio fue de 30 y 27 tumores, para el modelo de CNE de pulmón y de colon, respectivamente. Tras finalizar el período de tratamiento y extraer dichos tumores, lo primero que se confirmó es que seguían manteniendo las características de CNE

presentes en las líneas celulares de las que se derivaron. Para ello junto con una hematoxilina-eosina para confirmar la presencia de necrosis, se analizó por inmunohistoquímica la expresión de diferentes marcadores: cromogranina A (CgA), sinaptofisina, proteína Ki67 y p53. Los cuatro marcadores mostraron positividad, incluyendo el marcador subrogado de NEC, p53. Al medir la tasa de proliferación mediante la expresión del marcador Ki67, observamos valores medios de 86% en el caso de H460 y 78% para COLO320 (Figura 12).

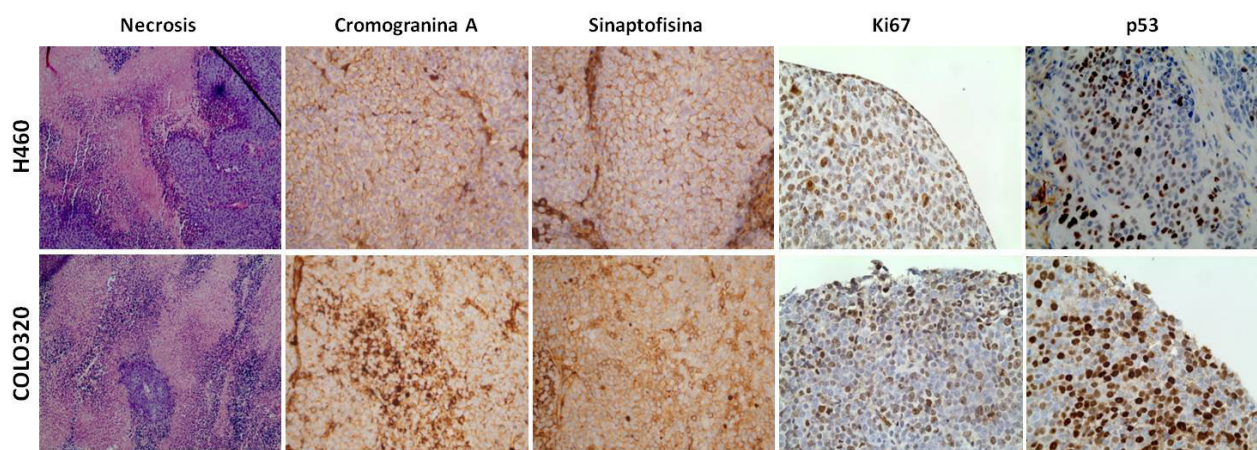


Figura 12. Caracterización molecular. Imágenes representativas de H&E, que nos muestra la presencia de grandes zonas de necrosis, y de inmunohistoquímica para CgA, Sinaptofisina, Ki67 y p53, en los tumores del grupo control de los ambos modelos de xenoinjerto (H460 y COLO320). En las imágenes observamos la positividad para los cuatro marcadores de CNEs con un aumento de 400x.

Estos resultados confirman que los tumores generados a partir de las líneas celulares humanas, H460 y COLO320, mantienen las características asociadas al carcinoma neuroendocrino durante el desarrollo tumoral en los modelos de xenoinjerto, con un Ki67 > 55%.

4.4.2 Análisis de la expresión de VEGF-A, VEGF-B y PIGF como dianas de aflibercept y bevacizumab

Tanto aflibercept como bevacizumab han mostrado una elevada actividad antitumoral, tanto en el modelo de CNCG de pulmón como en CNE de colon. Ambos fármacos inhiben el proceso de angiogénesis secuestrando al ligando VEGF-A y adicionalmente a los ligandos VEGF-B y PIGF en el caso de aflibercept.

En primer lugar quisimos confirmar que los niveles proteicos de VEGF-A, VEGF-B y PIGF se veían alterados de forma acorde a la inhibición en el crecimiento tumoral que habíamos observado. Mediante un ensayo ELISA analizamos los niveles de VEGF-A y observamos que tanto aflibercept como bevacizumab disminuyen de forma significativa su expresión tanto en el modelo de CNCG de pulmón ($p < 0,05$) como en el de CNE de colon ($p < 0,001$, Figura 13A). La expresión de los ligandos

VEGF-B y PlGF fue analizada mediante la técnica de western-blot. Los niveles de ambas proteínas disminuyen de forma significativa con el tratamiento de aflibercept en ambos modelos (H460 $p < 0,001$; COLO320 $p < 0,05$), pero no con bevacizumab ya que estos ligandos no son dianas de este fármaco (Figura 13B).

Estos resultados nos confirman que ambos fármacos actúan de forma eficiente sobre sus dianas y como consecuencia provocan una inhibición en el crecimiento de los tumores en ambos modelos. Sin embargo, nuestros resultados indican que aflibercept es capaz de parar e incluso reducir el tamaño tumoral en los CNCG de pulmón mientras que eso no ocurre en el modelo de CNE de colon. Este hecho sugiere la existencia de algún mecanismo molecular adicional que explique esta diferencia entre ambos modelos.

4.5 Papel de aflibercept más allá de su interacción con ligandos VEGF

En 2015, Kanda A. *et al* demuestran una nueva función antiangiogénica para aflibercept, independiente de su unión a los miembros de la familia VEGF, al identificar a la Galectina-1 (Gal-1) como una nueva diana de este fármaco. Este estudio revela que aflibercept se une con gran afinidad a esta proteína, neutralizándola con gran eficacia (58).

4.5.1 Efecto de los tratamientos anti-VEGF sobre la expresión de Gal-1

Para confirmar si el tratamiento con aflibercept modulaba los niveles de Gal-1 en nuestros modelos de xenoinjerto analizamos, mediante WB, la expresión de esta proteína en los tumores de ambos modelos animales.

En el modelo de CNCG de pulmón (H460) se observó una disminución significativa de los niveles de Gal-1 en los tumores tratados con aflibercept ($p < 0,05$) mientras que esa reducción no se observó en los tumores tratados con bevacizumab (Figura 14A). Sin embargo, en el modelo de CNE de colon (COLO320) los tumores tratados con aflibercept no mostraron niveles de Gal-1 significativamente diferentes a los del grupo control (Figura 14B). Si aflibercept interacciona con gran afinidad con Gal-1, ¿por qué en el modelo de CNE de colon no se produce una disminución de los niveles de esta proteína en los tumores tratados con aflibercept?

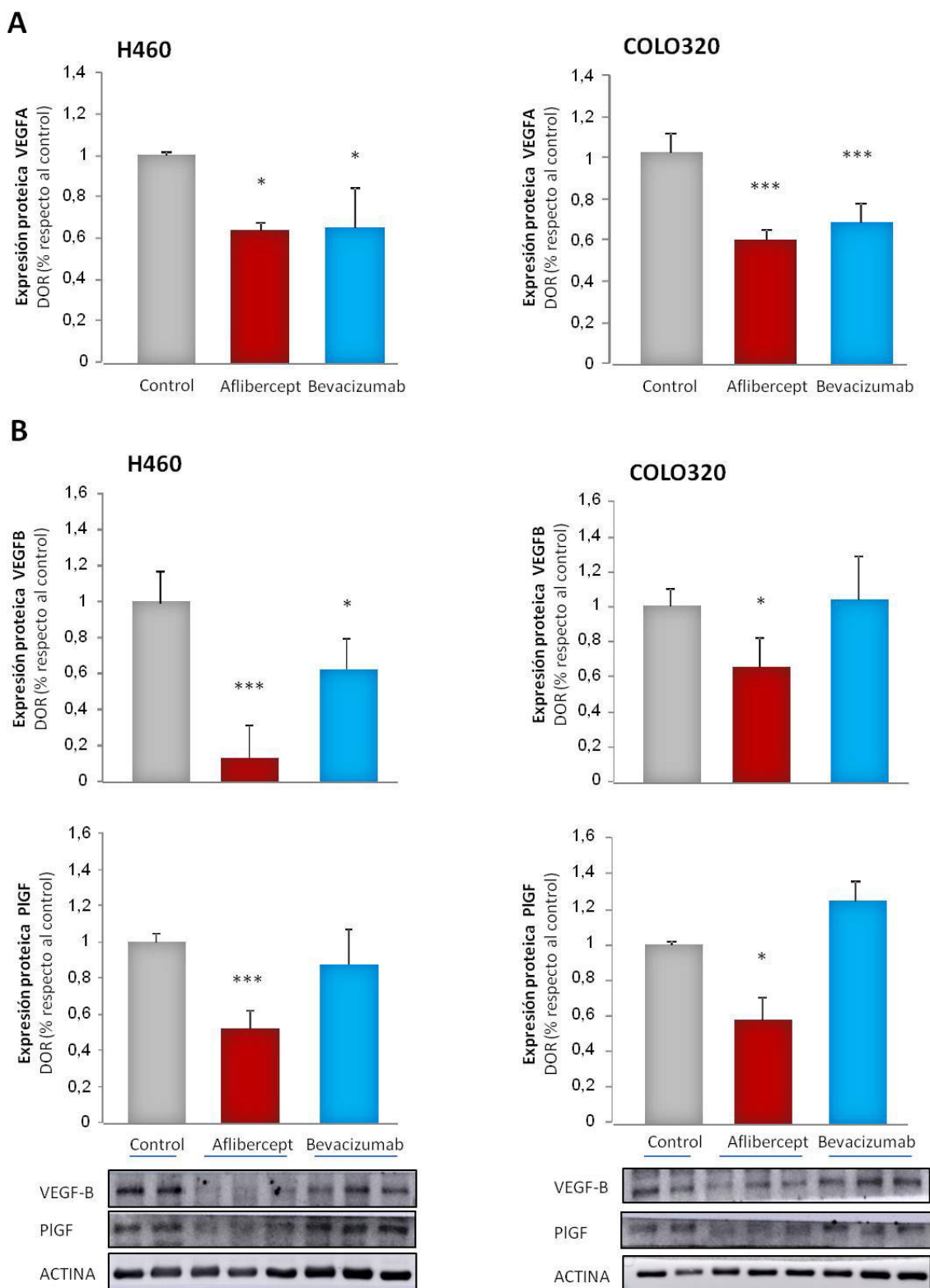


Figura 13: Efecto del aflibercept y el bevacizumab en la regulación de la angiogénesis a través de los ligandos de la familia VEGF. A) Cuantificación por ELISA, de los niveles de proteína total de VEGF-A, en los tres grupos de estudio, control, aflibercept y bevacizumab, ambos fármacos disminuyen de forma significativa los niveles de la proteína. B) Cuantificación por Western-Blot, de los niveles de proteína total de VEGF-B y PIGF en los tres grupos de estudio, confirmando la inhibición por aflibercept. Los resultados fueron expresados como cambios en la expresión relativa frente al control para cada uno de los tratamientos. Los WB fueron normalizados por actina y se representa la media \pm EE (n=3 experimentos independientes). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

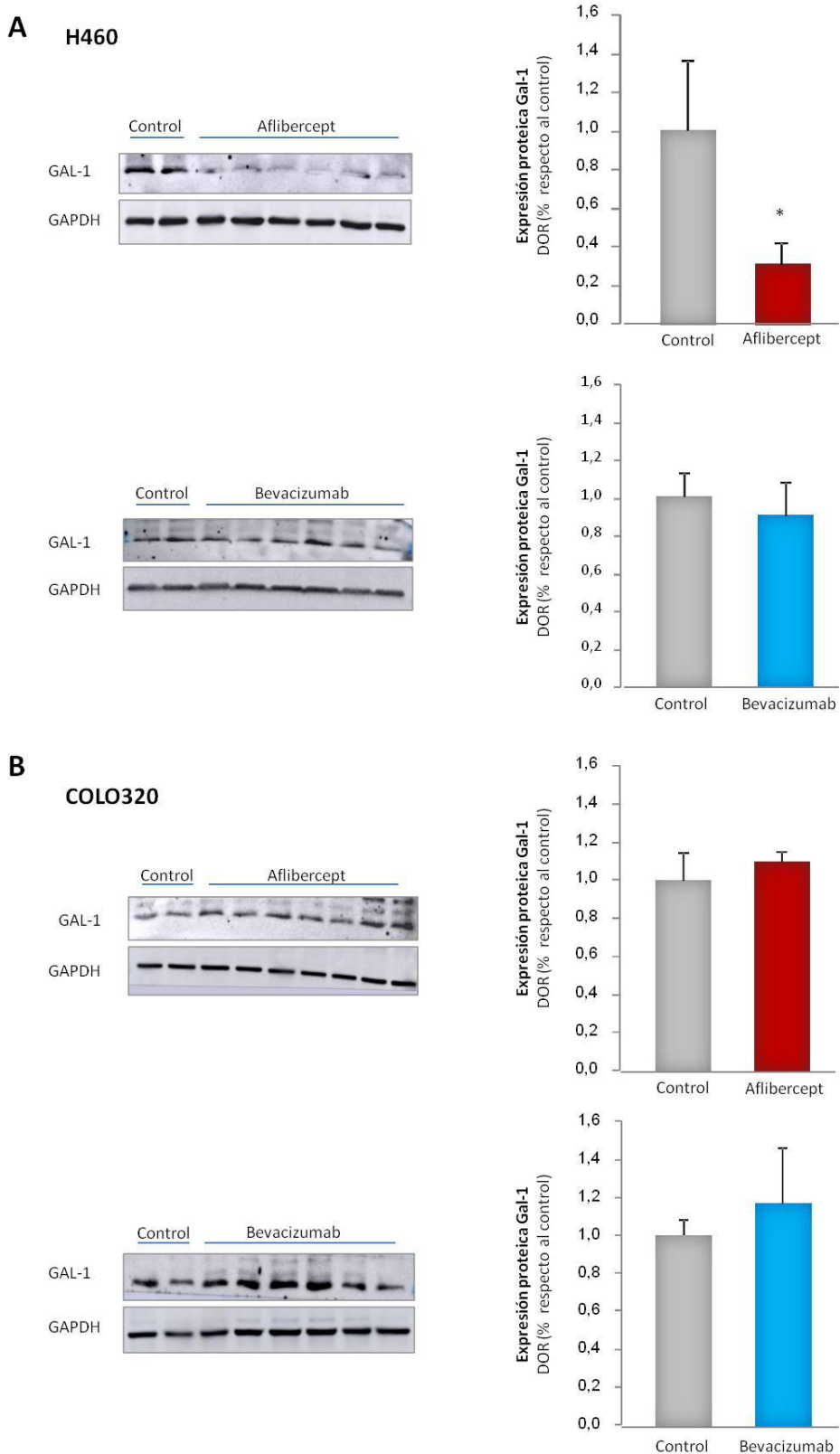


Figura 14: Efecto de los tratamientos anti-VEGF sobre la expresión de Gal-1 en modelos de CNE. A) Modelo H460, B) Modelo COLO320. Cuantificación por Western-Blot, de los niveles de expresión de la proteína Gal-1 en los tumores tratados con aflibercept (rojo) y bevacizumab (azul) con respecto a su grupo control (gris). Los resultados mostraron una disminución significativa de la expresión de Gal-1 en el modelo de CNCG tratado con aflibercept. Los resultados fueron normalizados por GAPDH y expresados en %. Se representa la media \pm EE (n=3 experimentos independientes) * $p < 0,05$

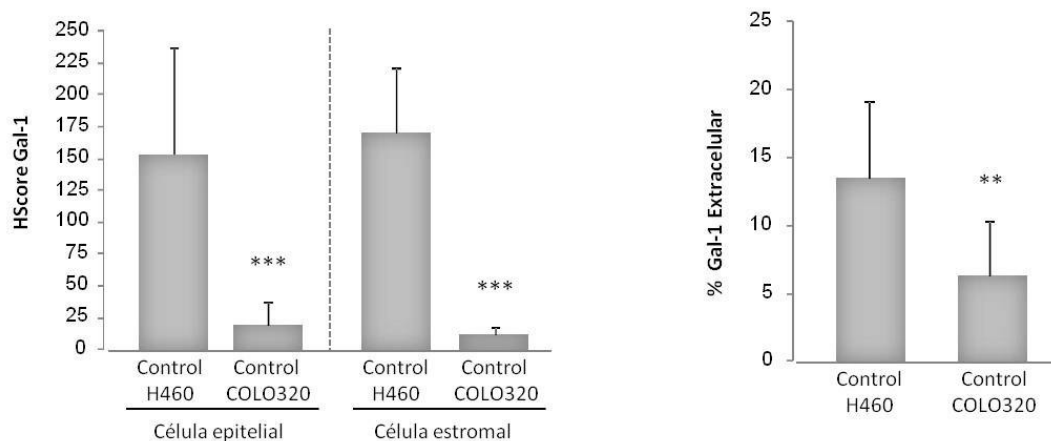
Realizamos un análisis de los niveles basales y de localización de Gal-1 en los tumores control de ambos modelos mediante inmunohistoquímica. Se ha descrito que Gal-1 está localizada a nivel epitelial, estromal y de la matriz extracelular (59). Por tanto, evaluamos los niveles de Gal-1 teniendo en cuenta todas sus localizaciones y los comparamos entre los dos modelos animales. Observamos que en el modelo de CNCG de pulmón (H460) los niveles de Gal-1 fueron significativamente más altos que en el modelo de CNE de colon (COLO320) en las células epiteliales y estromales ($p < 0,001$) y también en la matriz extracelular ($p < 0,01$) (Figura 15A).

Evaluamos si estas diferencias de los niveles de proteína entre ambos modelos eran debidas a una regulación transcripcional. Para ello usamos una sonda específica del gen humano *LGALS1* para cuantificar la expresión de Gal-1 del epitelio y una sonda específica del gen murino *Lgals1* para cuantificar la expresión de Gal-1 en el estroma. Los resultados obtenidos confirmaron que la menor expresión de Gal-1 en el modelo COLO320 era debida a una menor expresión génica tanto a nivel epitelial como estromal comparado con el modelo H460 ($p < 0,05$) (Figura 15B).

Estas diferencias en la expresión basal de Gal-1 observadas entre los dos modelos nos sugieren que aflibercept, además de su interacción con diferentes miembros de la familia VEGF, podría potenciar su acción de manera dependiente de Galectina-1. De tal forma que tumores con niveles elevados de Gal-1 serían más sensibles a aflibercept que aquellos con niveles bajos donde la reducción de Gal-1 por aflibercept no sería significativa.

Siguiendo con esta línea, realizamos varios cortes de los TMAs generados a partir de los tumores derivados en los dos modelos murinos para poder comparar, mediante inmunohistoquímica, la expresión de Gal-1 a nivel epitelial, estromal y en la matriz extracelular, en los grupos tratados comparados con su grupo control. Observamos que, en el modelo de CNCG de pulmón la reducción de proteína total que se observaba mediante WB (Figura 14) era debida a una reducción significativa en los niveles de Gal-1 en las tres localizaciones (Figura 16A) ($p < 0,01$). Sin embargo, en los tumores tratados con bevacizumab no había ningún cambio respecto a los tumores control ni en el epitelio, ni en el estroma ni en la matriz extracelular. Confirmando así que la Gal-1 no es una diana para bevacizumab. Los niveles de Gal-1 en el modelo de CNE de colon fueron prácticamente indetectables en todas las localizaciones, independientemente de si los tumores eran tratados o controles. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que los tumores con niveles elevados de Gal-1 presentan una mayor sensibilidad a aflibercept al presentar esta cuarta diana sobre la que el fármaco puede actuar.

A



B

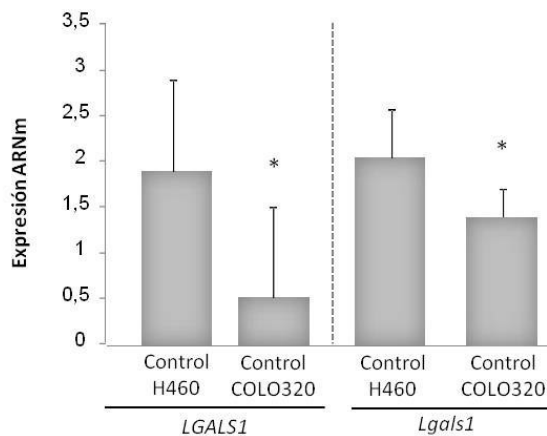


Figura 15: Niveles basales de Gal-1 a nivel epitelial, estromal, extracelular y de expresión génica (*LAGLS1* y *Lgals1*). Representación gráfica de las diferencias en los niveles de Gal-1 obtenidos en los tumores del grupo control, generados en ambos modelos murinos. A) Cuantificación por inmunohistoquímica de los niveles de la Gal-1 en las células epiteliales y estromales, junto con el porcentaje a nivel extracelular. B) Cuantificación de los niveles de expresión de ARNm para el gen que codifica la Gal-1 a nivel epitelial (sonda humana: *LGALS1*) y a nivel estromal (sonda murina: *Lgals1*). Los tumores generados en el modelo H460 presentan niveles significativamente más altos de Gal-1 que los generados en el modelo de COLO320. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

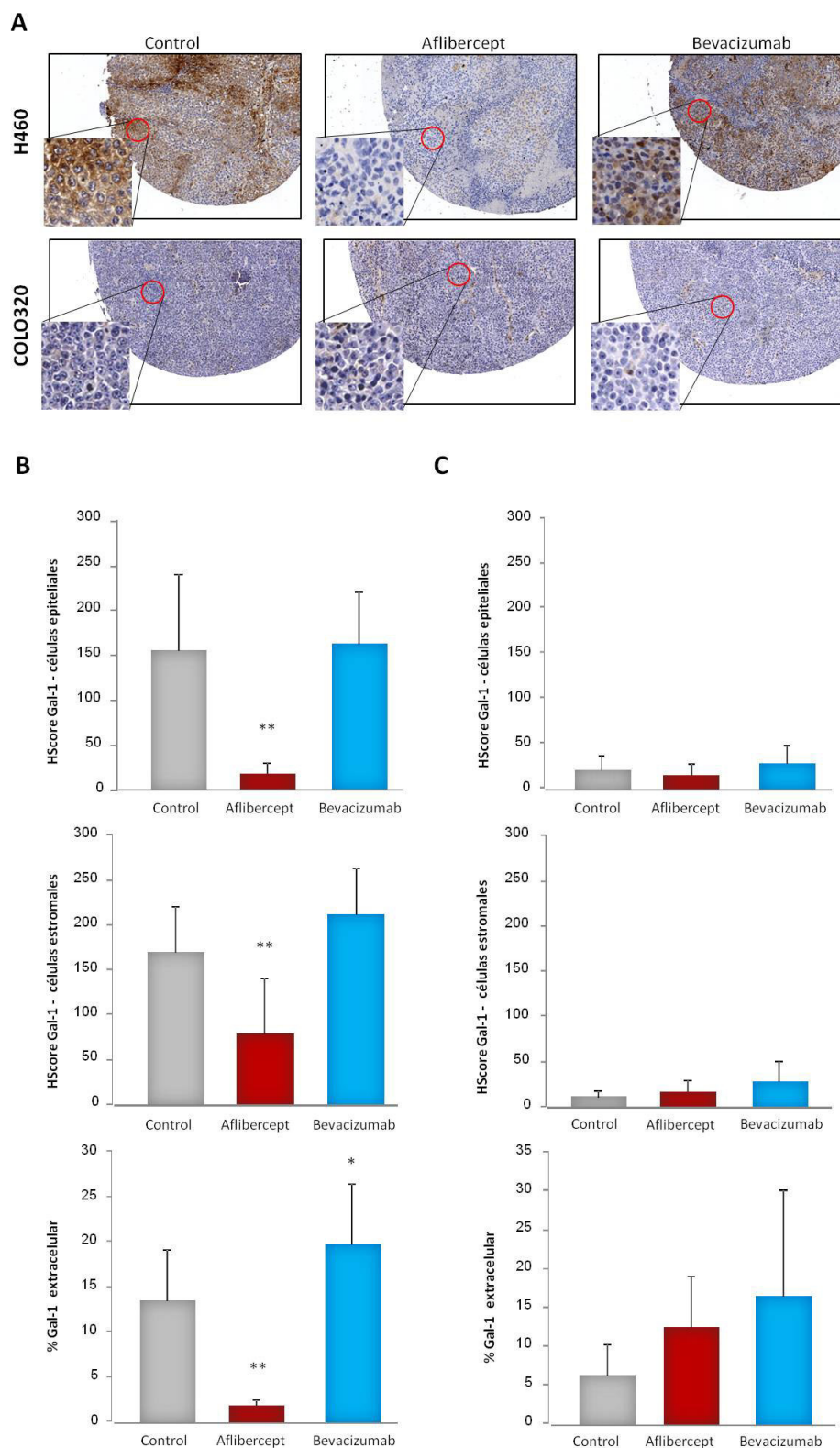


Figura 16: Efecto de aflibercept y bevacizumab sobre la expresión de Gal-1 a nivel epitelial, estromal y extracelular. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica realizadas en cortes de TMA generados a partir de los dos modelos murinos (H460 y COLO320) para comparar los niveles de Gal-1 en los grupos control y tratados (A). Representación gráfica de los niveles de Gal-1 en todas sus localizaciones, en los grupos tratados comparados con su grupo control, en el modelo H460 (B) y COLO320 (C). Observamos una reducción significativa de los niveles de Gal-1 en todas sus localizaciones, al tratar con aflibercept pertenecientes al modelo NCI-H460. Las diferencias se establecieron con respecto al grupo control. ** $p < 0,01$

4.5.2 Efecto de aflibercept en la vía angiogénica dependiente de Gal-1

Gal-1 juega un papel muy importante en la angiogénesis ya que es capaz de unirse al co-receptor de membrana neuropilin-1 (NRP1) y activar el receptor VEGFR2, independientemente de ligando, a través de la fosforilación de la tirosina-1214 (60).

Para confirmar si la reducción de Gal-1 por aflibercept afecta a la activación de VEGFR2 analizamos, mediante WB, los niveles de fosforilación de este receptor en los tres grupos de estudio del modelo de CNCG de pulmón. Observamos una reducción estadísticamente significativa de los niveles de fosforilación de la proteína VEGFR2 (Y1214) en los tumores tratados con aflibercept comparados con el grupo control ($p < 0,05$). Sin embargo, los tumores tratados con bevacizumab mostraron niveles de fosforilación similares a los tumores control (Figura 17).

Este resultado confirma que el tratamiento con aflibercept es capaz de inhibir la activación de VEGFR2, no solo impidiendo la unión de su ligando VEGF-A sino también interrumpiendo su activación dependiente de Gal-1.

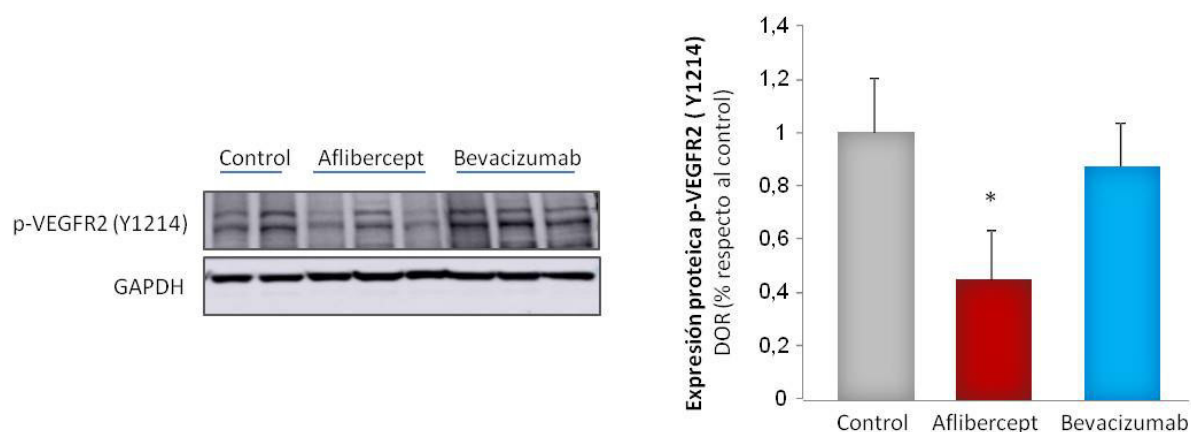


Figura 17: Efecto del aflibercept en la vía angiogénica dependiente de Gal-1. Cuantificación y representación mediante western-blot de la proteína fosforilada VEGFR2 (Y1214) en el grupo control y en los dos tratamientos, aflibercept y bevacizumab. El tratamiento con aflibercept reduce de forma significativa los niveles de p-VEGFR2. Los resultados fueron normalizados por GAPDH y las diferencias están representadas con respecto al grupo control. Se representa la media \pm EE (n=3 experimentos independientes). * $p < 0,05$

4.5.3 Efecto de aflibercept en la motilidad celular y la remodelación de la matriz extracelular a través de la modulación de Gal-1

Un estudio publicado en los últimos años demuestra que Gal-1 reduce los niveles de expresión de los genes que codifican para los colágenos 3 y 5 (*COL3A1* y *COL5A1*) (61). Estas proteínas están implicadas en el mantenimiento de la matriz extracelular, así su reducción por Gal-1 favorecería la motilidad celular. La evaluación de *COL3A1* y *COL5A1*, mediante PCR cuantitativa, mostró una sobreexpresión significativa de ambos genes en los tumores tratados con aflibercept al compararlos con el

grupo control (*COL3A1*, $p < 0,05$; *COL5A1*, $p < 0,01$) (Figura 18A). Sin embargo, los tumores tratados con bevacizumab mostraron niveles de expresión similares al grupo control.

Gal-1, además de regular de forma negativa la expresión de los colágenos, también se ha descrito que regula positivamente la expresión de la metaloproteinasa 2 (MMP2) (61). MMP2 pertenece a la familia de las metaloproteinasas (MMPs) que son, en gran parte, responsables de la remodelación de la matriz extracelular necesaria para que se produzca la migración de la célula tumoral. Mediante WB, se evaluaron los niveles de MMP2 y se observó que los tumores tratados con aflibercept presentaban niveles de MMP2 significativamente reducidos respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Figura 18B).

Para confirmar que estas regulaciones eran debidas a la reducción de los niveles de Gal-1 libre por aflibercept, analizamos *COL5A1*, *COL3A1* y MMP2 en el modelo de CNE de colon donde los niveles basales de Gal-1 eran prácticamente indetectables. Observamos que el tratamiento con aflibercept no afectaba a la expresión génica de ninguno de los colágenos analizados comparados con su grupo control. En el caso de la proteína MMP2, observamos un aumento significativo de su expresión, indicando que no sólo aflibercept no reducía el nivel de esta proteína sino que lo aumentaba (Figura 19).

Estos resultados apoyan que en los tumores con niveles elevados de Gal-1 el tratamiento con aflibercept afectaría negativamente a la motilidad celular, a través del aumento en la expresión de colágenos y de la reducción de MMP2, inhibiendo la remodelación de la matriz extracelular. Mientras que en los tumores con bajos niveles de Gal-1 estos procesos no son bloqueados con este tratamiento.

4.5.4 Efecto del aflibercept en la transición epitelio-mesénquima a través de la señalización por Galectina-1

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso caracterizado por la conversión fenotípica de células epiteliales diferenciadas. La pérdida de marcadores epiteliales como la E-Cadherina y la ganancia de marcadores mesenquimales como la vimentina o la α -actina del músculo liso (α -sma, smooth muscle actin, en inglés) son características de este proceso (62). Gal-1 regula la TEM induciendo la sobreexpresión de la proteína Snail que a su vez va asociado con una desregulación de E-cadherina y una deslocalización de β -catenina. Esta regulación ha sido previamente descrita tanto en carcinoma hepatocelular (62) como en cáncer gástrico (63).

Para confirmar si la reducción de Gal-1 en los tumores tratados con aflibercept afectaba al proceso de TEM evaluamos diferentes marcadores. Este proceso está caracterizado por la pérdida de la

adhesión célula-célula mediada por la ruptura el complejo formado por E-cadherina y β -catenina. De manera que en las etapas tempranas de la TEM los niveles de E-cadherina se reducen y esto induce una traslocación de β -catenina de la membrana al citoplasma. Mediante inmunofluorescencia, evaluamos la expresión y localización de E-cadherina y β -catenina. Tanto los tumores tratados con bevacizumab como los controles presentaban una reducción significativa en los niveles de E-cadherina en la membrana celular comparado con los tumores tratados con aflibercept (Figura 20A). Esta reducción de E-cadherina iba acompañada de la traslocación de β -catenina de la membrana al citoplasma en los tumores control y tratados con bevacizumab, mientras que con aflibercept ambas proteínas se mantenían en la membrana incrementando la estabilidad de las uniones de las células (Figura 20B).

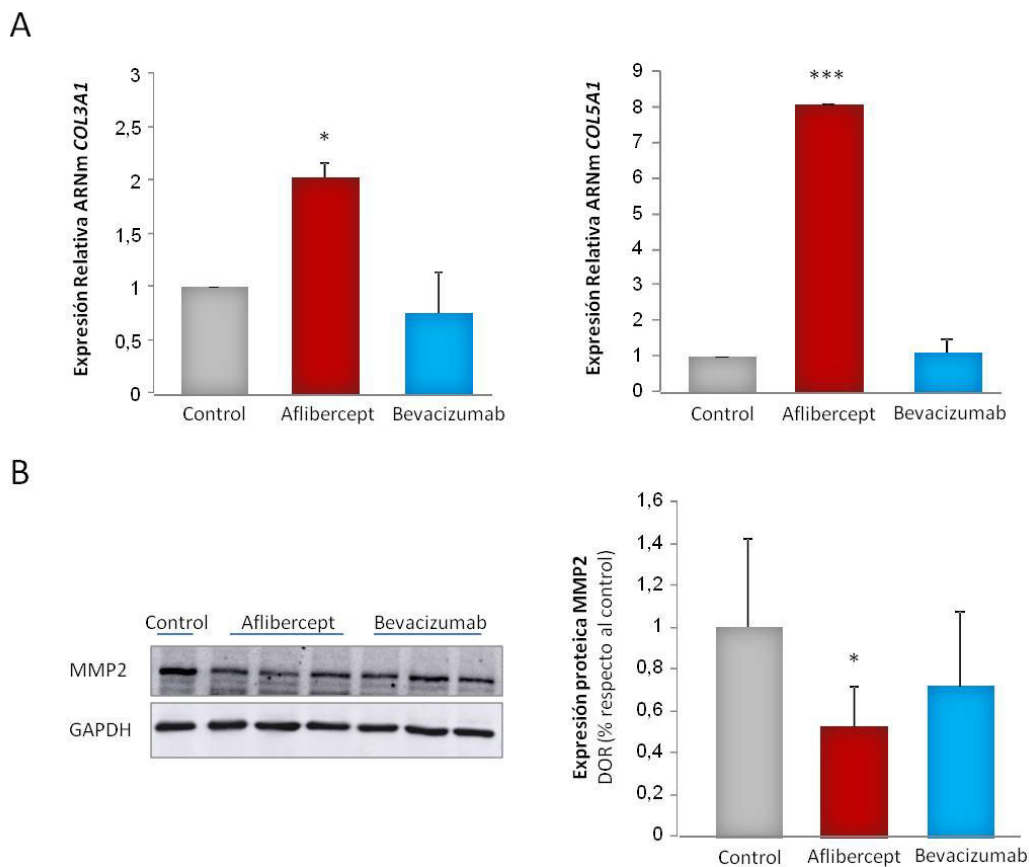


Figura 18: Efecto de aflibercept sobre la remodelación de la matriz extracelular y motilidad celular. A) Niveles de expresión génica de *COL3A1* y *COL5A* en los tumores tratados con aflibercept o bevacizumab con respecto al grupo control, observamos una sobreexpresión de ambos genes con aflibercept. Representamos los valores de expresión de ARNm de los tratamientos relativizados con respecto al grupo control. B) Niveles de proteína total de MMP2 en los tumores tratados con aflibercept o bevacizumab con respecto al grupo control, observamos que el grupo tratado con aflibercept reduce los niveles de esta proteína. Los resultados del WB fueron normalizados por GAPDH y las diferencias las calculamos con respecto al grupo control, se representa la media \pm EE (n=3 experimentos independientes). *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$

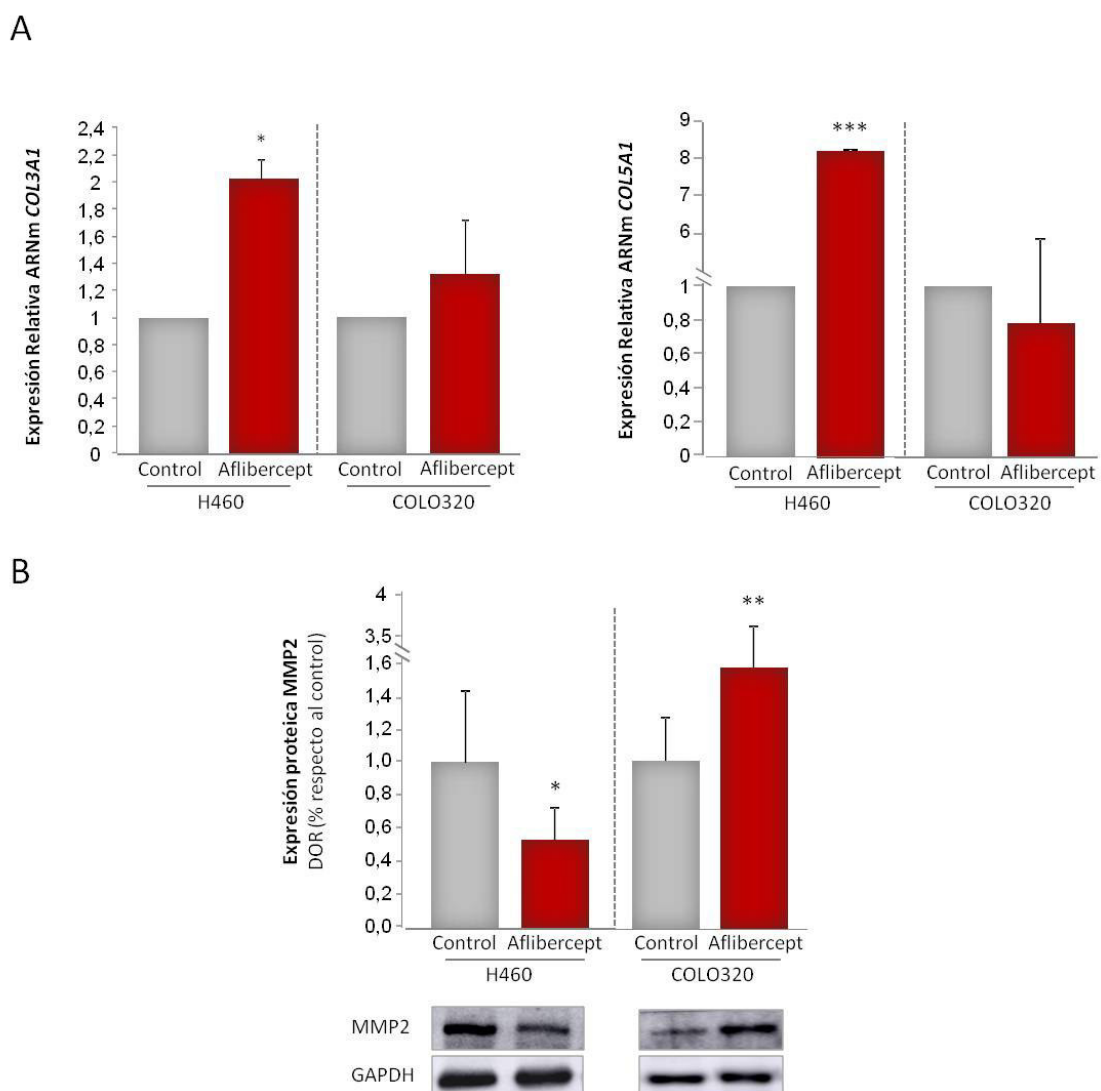


Figura 19: Comparación de los niveles de proteínas relacionadas con la remodelación de la matriz extracelular, entre el modelo de CNCG de pulmón (Gal-1 alta) y de CNE de colon (Gal-1 baja). A) Representación de los niveles de expresión de ARNm de *COL3A1* y *COL5A1* en los tumores tratados con afibercept con respecto al grupo control en ambos modelos. B) Niveles de proteína total de MMP2 para los tumores tratados con afibercept con respecto al grupo control en los dos modelos. Los resultados fueron normalizados por GAPDH y se representa la media \pm EE (n=3 experimentos independientes). Las diferencias en cada modelo las calculamos con respecto a su grupo control. ** p<0,001; * p<0,01; * p<0,05

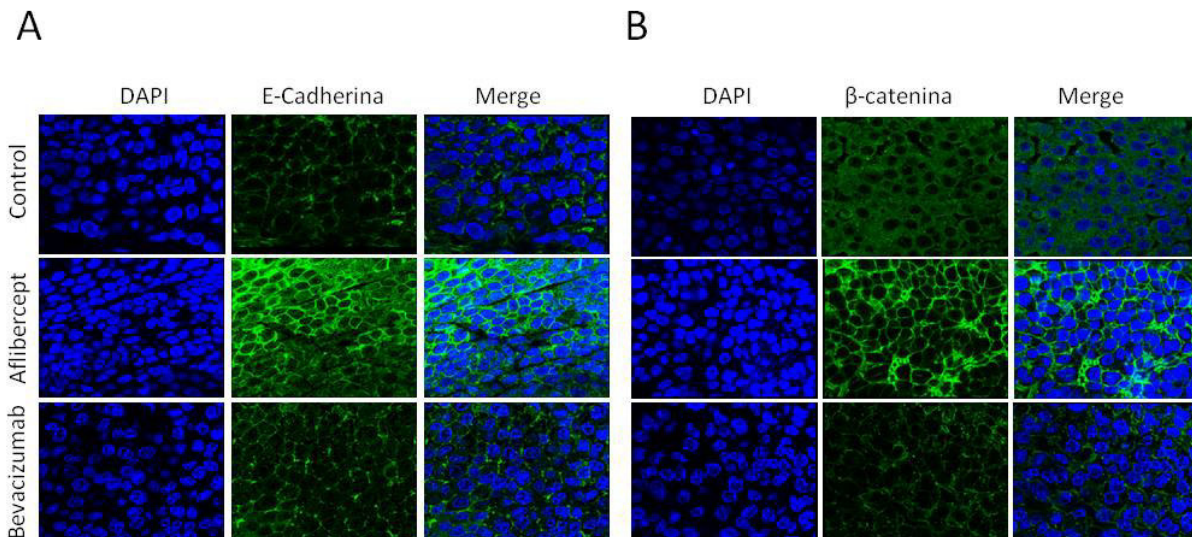


Figura 20. Efecto del aflibercept sobre el complejo E-cadherina/β-catenina como marcador de la TEM. A) Inmunofluorescencia de los niveles de E-cadherina. Se observa una reducción de su expresión en la membrana celular en los tumores del grupo control y tratados con bevacizumab comparado con los tumores tratados con aflibercept B) Inmunofluorescencia para β-catenina en la que observamos una deslocalización de esta proteína tanto en el grupo control como en los tumores tratados con bevacizumab comparado con los tratados con aflibercept donde β-catenina se mantiene localizada en la membrana celular.

Uno de los principales inductores de la TEM es la proteína Snail, un represor transcripcional de E-cadherina. Puesto que los tumores control y tratados con bevacizumab mostraron una reducción en los niveles de E-cadherina y ya se había descrito la regulación de Snail mediante Gal-1, analizamos si existían diferencias en la expresión de esta proteína entre los diferentes grupos. Observamos que los tumores tratados con aflibercept presentaban una disminución significativa de la expresión de Snail con respecto al grupo control (Figura 21A). Por tanto si el represor transcripcional se reduce E-cadherina mantiene su expresión sin cambios como observamos por inmunofluorescencia. Hay que mencionar que el tratamiento con bevacizumab también reduce, aunque en menor medida, el nivel de expresión de Snail (Figura 21A). Este efecto ya fue observado por Wanami *et al.* en células tumorales de mama y ellos describen que esta reducción es mediada por una función autocrina de VEGF (63).

Otra de las características que define la TEM es la sobreexpresión de marcadores mesenquimales como vimentina. Analizamos su expresión por inmunohistoquímica y observamos una disminución significativa en aquellos tumores tratados con aflibercept comparados con los tumores control o tratados con bevacizumab (Figura 21B) indicando que las células tumorales de estos últimos grupos presentan características mesenquimales mientras que esto no ocurre en las de los tumores tratados con aflibercept.

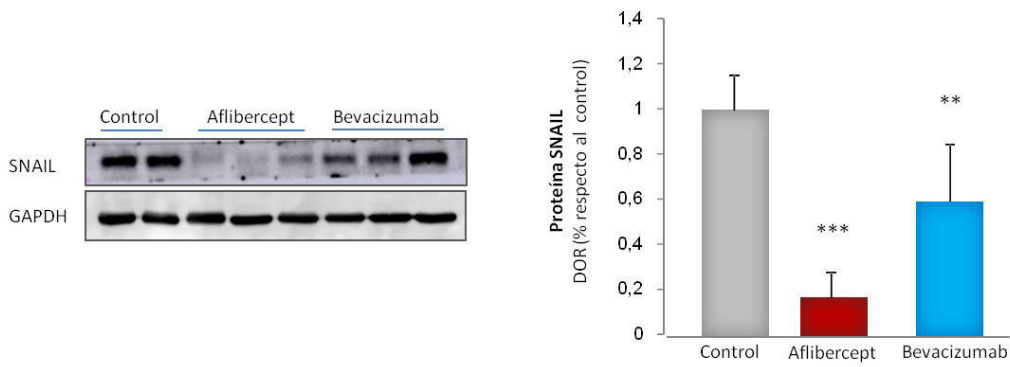
Estos resultados nos confirman que en los tumores tratados con aflibercept, y con una reducción de Gal-1, no se inicia la TEM ya que el complejo formado por E-cadherina y β -catenina permanece estable y no se expresan marcadores mesenquimales como la vimentina.

La activación de los fibroblastos asociados a cáncer (FAC) también se ha descrito como una parte esencial de la TEM y existen diferentes estudios en los que se concluye que Gal-1 está implicada en la activación de estos fibroblastos (64,65). Los FAC tienen un fenotipo activado similar a los miofibroblastos, caracterizados por la expresión de vimentina y α -SMA. La Gal-1 induce la expresión de α -SMA y regula la activación de los FAC (66,67). Analizamos la expresión de α -SMA en los tres grupos de tumores y observamos que junto con la disminución de la expresión de vimentina a nivel estromal (Figura 21B) también se observa una reducción significativa en la expresión de α -SMA en los tumores tratados con aflibercept comparado con el grupo control (Figura 21C). Indicando que el número de FAC, es decir que expresan vimentina y α -SMA, es significativamente menor cuando se trata con aflibercept. Sin embargo, los tumores tratados con bevacizumab presentaron niveles similares de vimentina y α -SMA a los tumores control (Figura 21B-C).

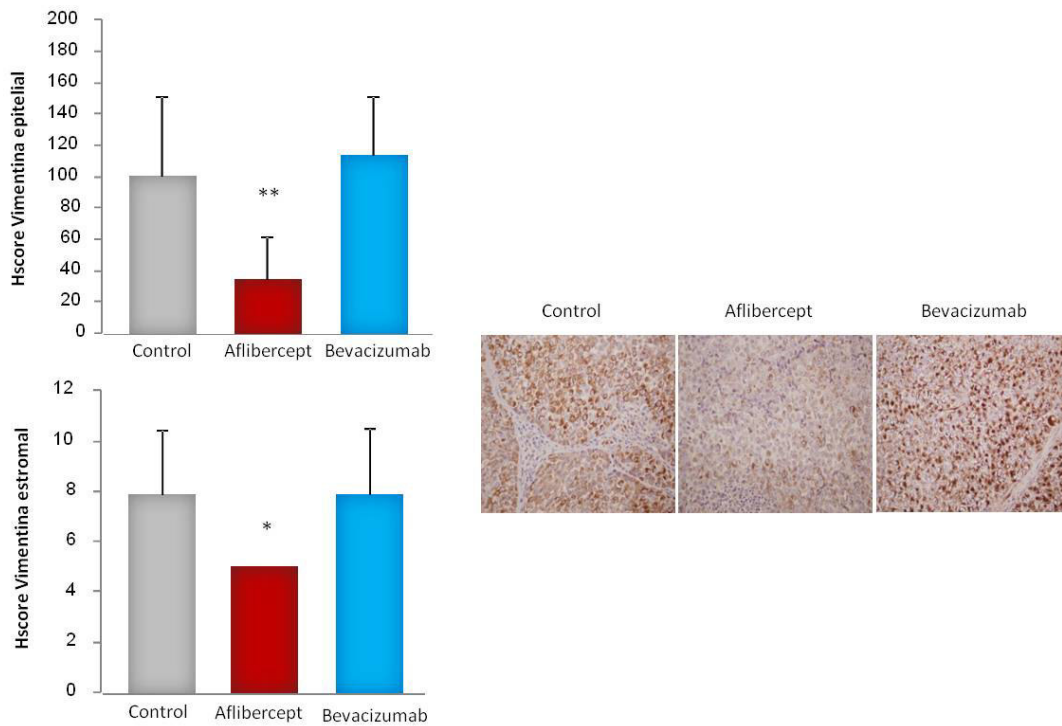
Comparamos los niveles de expresión de los diferentes marcadores de TEM entre el modelo de CNCG de pulmón (H460) y el modelo de CNE de colon (COLO320), confirmando que en este último no se observó ningún cambio significativo en la expresión de ninguno de los marcadores de TEM analizados entre el grupo aflibercept y el grupo control. Indicando que en este modelo aflibercept no está inhibiendo la TEM (Figura 22).

Por lo tanto, aflibercept sólo es capaz de inhibir la TEM y la activación de los FAC de manera dependiente de Gal-1.

A



B



C

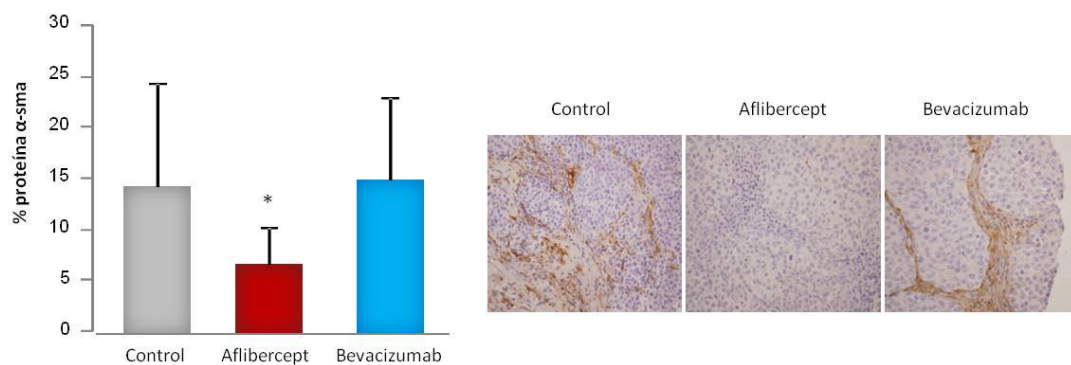


Figura 21. Efecto de aflibercept en la expresión de Snail y de los marcadores mesenquimales, Vimentina y α -sma. A) Western blot representativo y representación de los niveles de proteína total Snail en los tres grupos de estudio, control, aflibercept y bevacizumab. B) Cuantificación del análisis por inmunohistoquímica de los niveles de expresión de vimentina epitelial y estromal (HScore) para los tres grupos de estudio. C) Niveles de α -sma (HScore) en los tres grupos. Los paneles de la derecha muestran imágenes representativas de las inmunohistoquímicas realizadas. Observamos como el aflibercept disminuye los niveles de los tres marcadores de forma significativa con respecto al grupo control. Imágenes con un aumento de 400x. Diferencias establecidas con respecto al grupo control. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

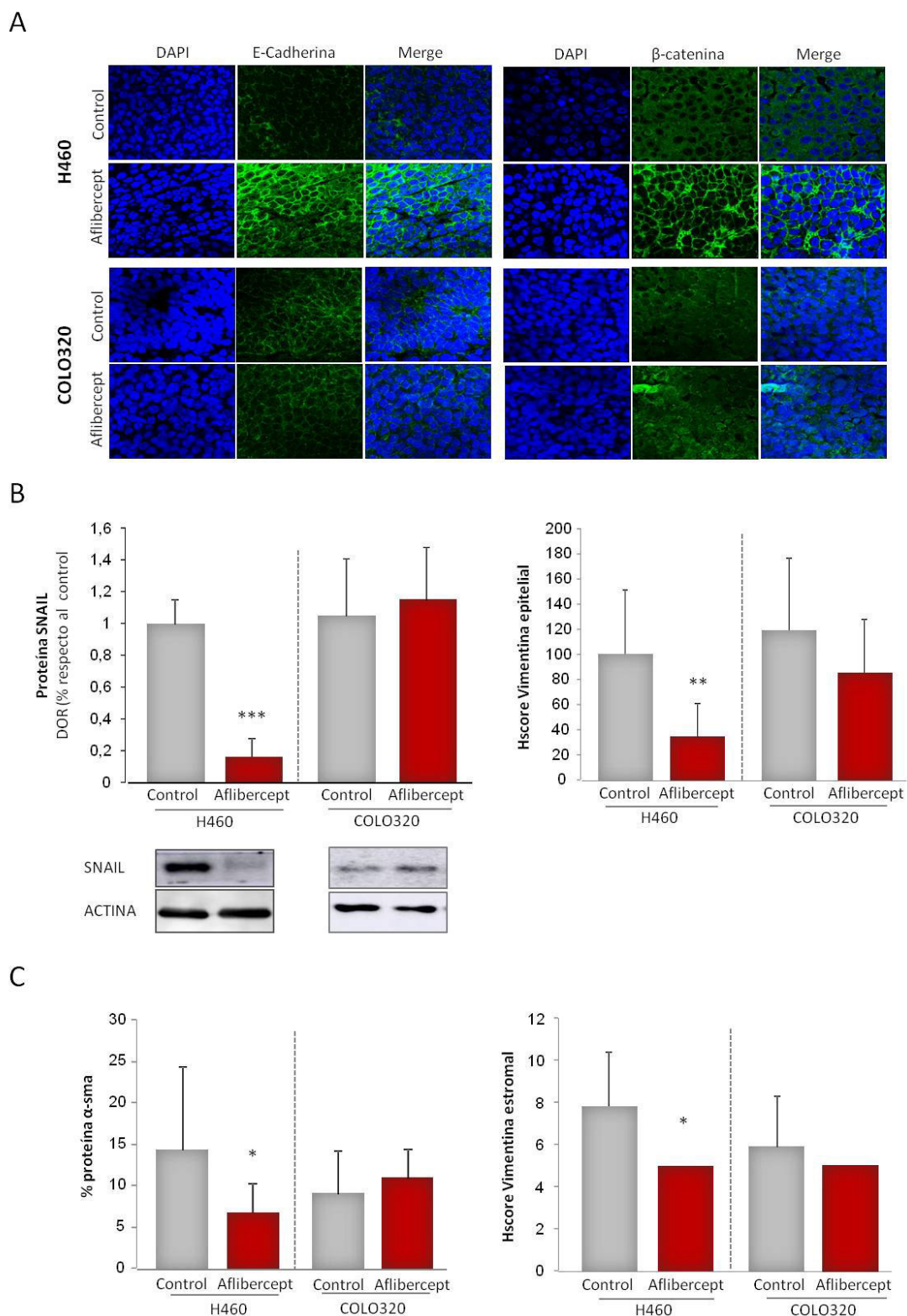


Figura 22. Comparación de los niveles de expresión de los marcadores TEM, entre el modelo H460 (Gal-1 alta) y de COLO320 (Gal-1 baja). A) Inmunofluorescencia de los niveles de E-cadherina y β -catenina en los tumores tratados con aflibercept con respecto al grupo control en ambos modelos. B) Niveles de proteína total Snail (western-blot) para los tumores tratados con aflibercept con respecto al grupo control en los dos modelos. C-D) Cuantificación inmunohistoquímica de los niveles de vimentina los niveles de α -sma (HScore), en los tumores tratados con aflibercept con respecto al grupo control en ambos modelos. Los resultados de WB fueron normalizados por Actina. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

4.6 Cribado de la expresión de Galectina-1 en pacientes con CNEs

Los resultados obtenidos mediante los dos modelos animales indican que aflibercept puede ser un tratamiento más eficaz en aquellos tumores con niveles elevados de Galectina-1. Quisimos analizar, mediante PCR cuantitativa, la expresión de *LGALS1* en muestras pareadas de tejido normal y tumoral de 12 pacientes con CNE para evaluar si existían diferencias en función del origen del tumor. Como podemos observar los pacientes con CNE de páncreas o de CNCG de pulmón presentan altos niveles de Galectina-1 en el tejido tumoral con respecto a su tejido normal. Sin embargo, los pacientes con CNE de colon mostraban niveles muy bajos de Gal-1 tanto en el tejido tumoral como normal (Figura 23). Estos resultados concuerdan con los niveles de expresión observados en nuestros modelos de CNE de pulmón y de colon. Además, apoya que los pacientes con CNE de páncreas también podrían verse beneficiados por el tratamiento con aflibercept al presentar niveles elevados de Gal-1.

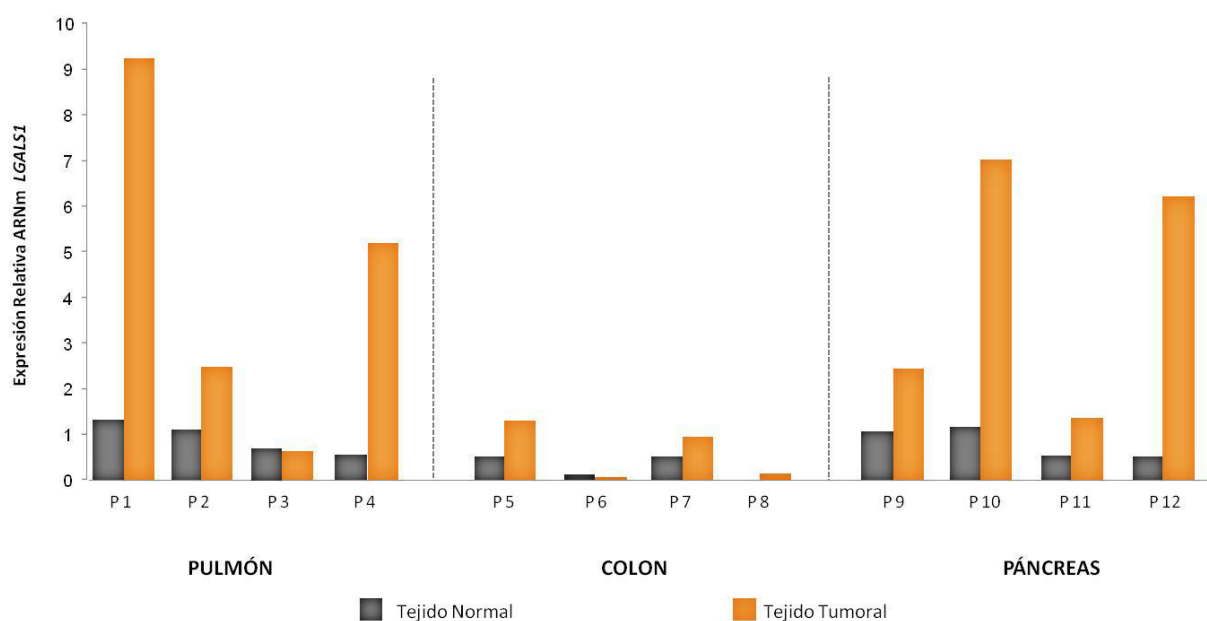


Figura 23. Expresión de *LGALS1* en pacientes con CNEs. Niveles de expresión en muestras pareadas de tejido normal y tumoral para pacientes con CNCG de pulmón, CNE de colon y CNE de páncreas. Observamos una alta expresión de Gal-1 en el tejido tumoral con respecto al tejido normal en los CNCG de pulmón y CNE de páncreas. En los pacientes con CNE de colon los niveles de Gal-1 fueron muy bajos tanto en tumor como tejido normal.

Este cribado debe realizarse en un mayor número de pacientes con CNE en estos órganos para confirmar los resultados y también sería interesante realizarlo en CNE de otras localizaciones para tener información sobre los niveles de expresión de Gal-1 en dichos órganos. Si estos resultados se validasen, el nivel de Galectina-1 podría convertirse en un marcador predictivo de la respuesta a aflibercept en CNEs y abrir una nueva opción terapéutica para este tipo de tumor.

4.7 Perfiles de expresión génica en los tumores generados en los dos modelos de xenoinjerto

Con el fin de identificar que procesos biológicos o rutas de señalización eran modulados por las terapias anti-VEGF se realizó un estudio transcriptómico utilizando el panel de Illumina PanCancer formado por 1385 genes relacionados con cáncer.

Para abordar el análisis de los datos generados utilizamos dos aproximaciones diferentes: enriquecimiento de genes (GSA, Gene Set Analysis, de sus siglas en inglés) y circuitos de señalización mediante la herramienta Hipathia. Para el análisis GSA se utilizó la herramienta bioinformática Gene Ontology (GO) para identificar procesos biológicos y la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) para identificar vías de señalización. Hipathia parte de la expresión génica obtenida y utilizando la base de datos KEGG genera una señal para cada circuito que se transmite a través de nodos hasta alcanzar un nodo efector.

Es importante tener en cuenta que partimos de un panel dirigido, con solo 1385 genes, y por tanto nos falta información sobre el resto del genoma. Esto hace que al no tener suficiente número de genes informativos en determinadas rutas no aparezcan como significativamente enriquecidas aunque en realidad lo estén.

Partiendo de este punto, en primero lugar realizamos un análisis de enriquecimiento mediante GO, en el cual obtenemos los procesos biológicos que están siendo significativamente representados. Estos procesos pueden estar sobrerrepresentados (enriquecidos en genes sobreexpresados) o infrarrepresentados (enriquecidos en genes infraexpresados). Cuando comparamos dentro de cada modelo animal los grupos tratados con sus grupos control observamos que el número de procesos biológicos significativamente enriquecidos es elevado (Tabla 4).

Tabla 4. Número de procesos GO enriquecidos en ambos modelos animales

		Procesos biológicos sobrerrepresentados (SR)	Procesos biológicos infrarrepresentados (IR)
H460	AH vs CH	354	259
	BH vs CH	168	267
COLO320	AC vs CC	84	140
	BC vs CC	163	168

AH: grupo aflibercept H460; BH: grupo bevacizumab H460; CH: grupo control H460; AC: Aflibercept COLO320; BC: Bevacizumab COLO320; CC: Grupo control COLO320

Para poder hacer un análisis más rápido y sencillo de los procesos enriquecidos más significativos decidimos poner un punto de corte y seleccionar los 10 procesos más significativos para cada grupo de estudio. Si nos fijamos en este “Top diez” observamos que el 90% de los procesos

infrarrepresentados (IR) en el grupo aflibercept del modelo CNCG de pulmón (H460) son específicos para este tratamiento y este modelo. Todos ellos están englobados en dos procesos biológicos generales, ciclo celular y ensamblaje de ADN. Sin embargo, los procesos IR identificados en el grupo bevacizumab de H460 como en los dos grupos de tratamientos de COLO320 fueron muy similares y estaban relacionados con procesos de corte y empalme (splicing) del ARN y empaquetamiento del ADN (Figura 24).

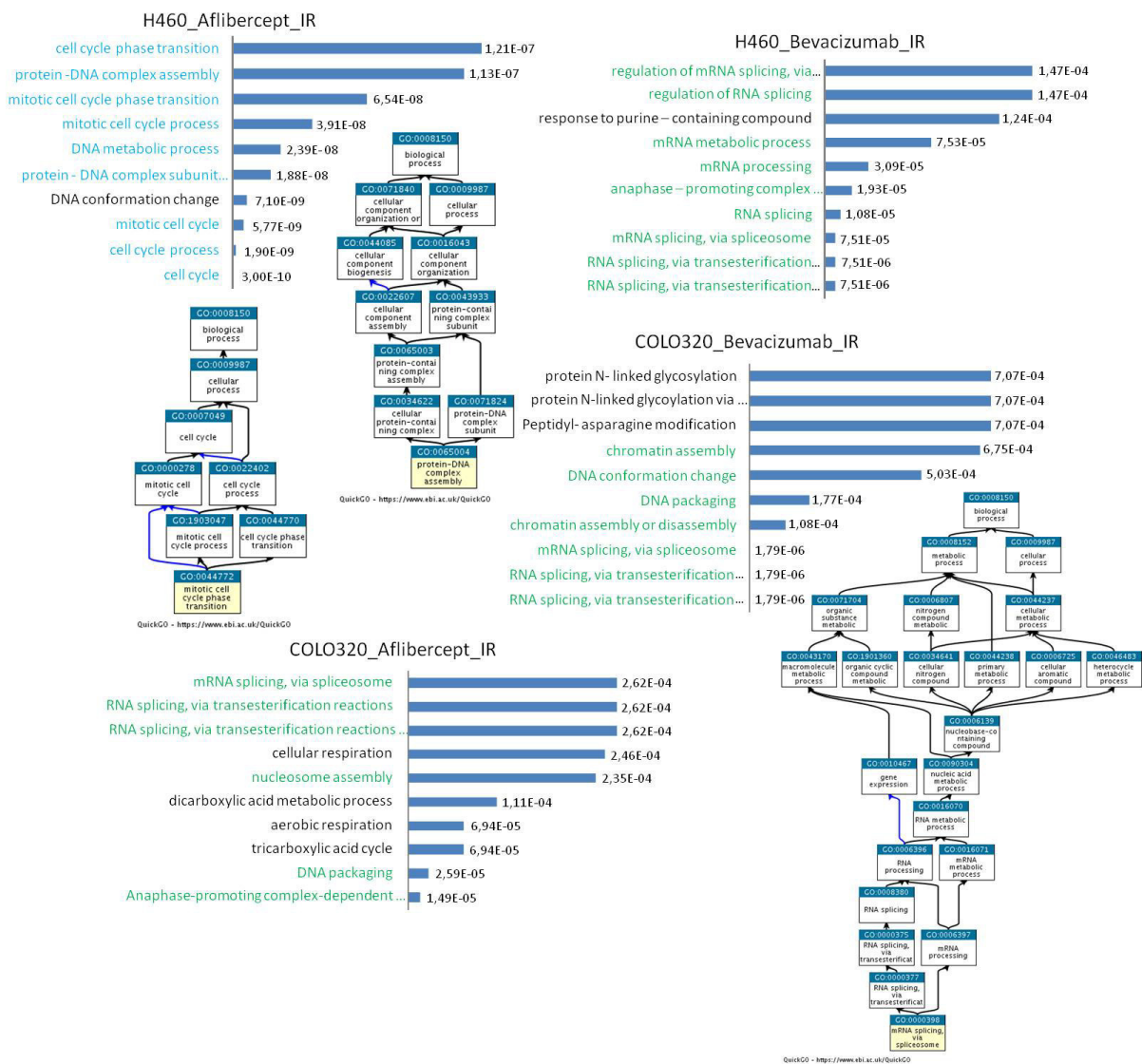


Figura 24. Gene Ontology (GO), procesos biológicos infrarrepresentados (IR). Representación gráfica de los 10 procesos más significativos para cada uno de los grupos de estudio y diagrama de las anotaciones GO de dichos procesos. Parte superior izquierda, procesos específicamente enriquecidos con aflibercept en H460 (azul), relacionados con ciclo celular y ensamblaje de ADN. En el resto de la imagen observamos que tanto en el grupo de bevacizumab en H460 como ambos tratamientos en COLO320 muestran procesos biológicos comunes (verde), relacionados principalmente con el proceso de corte y empalme del ARN y empaquetamiento de ADN.

Respecto a los procesos sobrerrepresentados (SR), observamos que en el modelo H460 ambos tratamientos tienen procesos biológicos específicos. En el caso de aflibercept dichos procesos están

relacionados con migración, motilidad y adhesión celular (Figura 25). Mientras que el grupo de bevacizumab están relacionados con la morfogénesis (estos procesos no se muestran en la figura por no estar directamente relacionados con cáncer). En COLO320 ambos tratamientos comparten procesos biológicos relacionados, fundamentalmente, con uniones celulares (Figura 25).

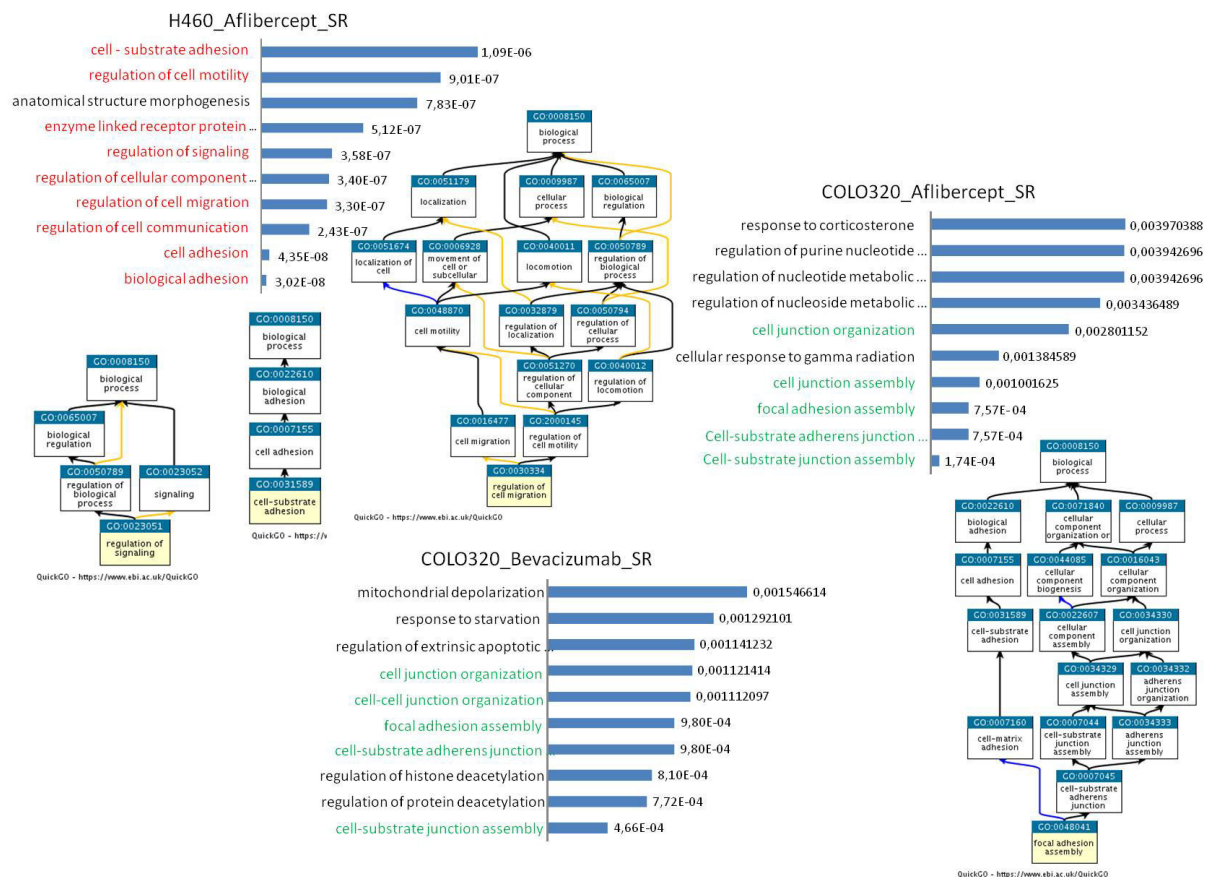


Figura 25. Gene Ontology (GO), procesos biológicos sobrerrepresentados (SR). Representación gráfica del p-value de los 10 procesos más significativos para cada uno de los grupos de estudio y diagrama de las anotaciones GO. Parte superior izquierda, procesos específicos para aflibercept en H460 (rojo) relacionados con migración, adhesión celular y motilidad. En COLO320, ambos tratamientos muestran procesos biológicos similares (verde), relacionados con uniones celulares. No se muestran los procesos biológicos para bevacizumab en H460, por estar relacionados todos ellos con morfogénesis.

En paralelo a este análisis de procesos biológicos, realizamos un GSA utilizando la base de datos KEGG para definir que rutas de señalización o de formación de complejos estaban siendo enriquecidas. En primer lugar se realizó un filtro para seleccionar aquellas rutas significativamente enriquecidas y relacionadas con cáncer. Observamos que para el grupo de aflibercept del modelo H460 sólo había 7 rutas SR significativas: rutas de cáncer en general, endocitosis, vía de señalización TGF-β, microARNs, interacción de receptores citoquina-citoquina, interacción de receptores de la matriz extracelular y vía de señalización del calcio. Las rutas IR en este mismo grupo fue mayor, las más significativas están relacionadas con ciclo celular, ciclo de Krebs, recombinación homóloga, replicación de DNA, fosforilación oxidativa y reparación de ADN. De las rutas SR en el grupo

bevacizumab de H460 destacan la vía de señalización VEGF, citotoxicidad mediada por las NK, resistencia a platinos, resistencia endocrina, resistencia a inhibidores EGFR tirosina-cinasa y la vía de señalización de mTOR y FoxO. En este grupo solo encontramos 4 rutas IR: senescencia celular, vías de señalización TNF e IL-17 y necroptosis. En el modelo generado a partir de la línea COLO320, encontramos dos rutas SR en el grupo tratado con aflibercept: degradación de lisinas y recombinación homóloga. Al igual que ocurre en el modelo de H460 las rutas IR son más abundantes siendo las más significativas: ciclo celular, vías metabólicas, senescencia celular, vía de señalización del receptor de las células B y células T, resistencia endocrina, apoptosis, vía HIF-1 y vía de señalización p53. En el grupo de bevacizumab, únicamente encontramos SR la ruta relacionada con el metabolismo de fosfolípidos y glicerolípidos; y proteínas asociadas al retículo endoplasmático, regulación transcripcional y de la ARN polimerasa como rutas IR.

Para la segunda aproximación en el análisis de este perfil de expresión génica, utilizamos Hipathia y la base de datos KEGG. Como hemos mencionada anteriormente al no tener la información sobre el genoma completo muchas de las rutas identificadas por esta herramienta no tienen información suficiente para que podamos considerarlo un resultado fiable. Solo hemos seleccionado aquellas rutas en las que teníamos información sobre un número mínimo de genes. El grupo aflibercept del modelo H460 fue el más informativo de todos, por esa razón hemos seleccionado este grupo para mostrar sus resultados. Una de las rutas más alterada e identificada por Hipathia fue la vía de señalización del ciclo celular, la señal de esta vía se ve afectada tanto por genes sobreexpresados como por genes infraexpresados. Analizando por un lado aquellos circuitos que transmiten una señal de inhibición a través de su último nodo encontramos a *CDKN1A* (p21) que al estar activo estaría inhibiendo el ciclo celular a través de la inhibición de CDK2 y CDK4 (Figura 26, panel superior); y también tendríamos a *PRKCA* que dependiendo del tejido actúa como supresor del ciclo activando a su vez a *CDKN1A* (Figura 26, segundo panel superior). Por otro lado, si analizamos aquellos circuitos que transmiten una señal de activación, encontramos que *CDK4* estaría “apagado” y afectaría de forma negativa al ciclo celular. En esta misma línea también encontramos el circuito de señalización cuyo nodo final lo componen *RAD21*, *STAG1*, *SMC3* y *SMC1B* que codifican para diferentes cohesinas que se activan después de la replicación y antes de entrar en la fase de mitosis. Este nodo también se encuentra “apagado” ejerciendo una función de inhibición sobre el ciclo celular (Figura 26, paneles inferiores).

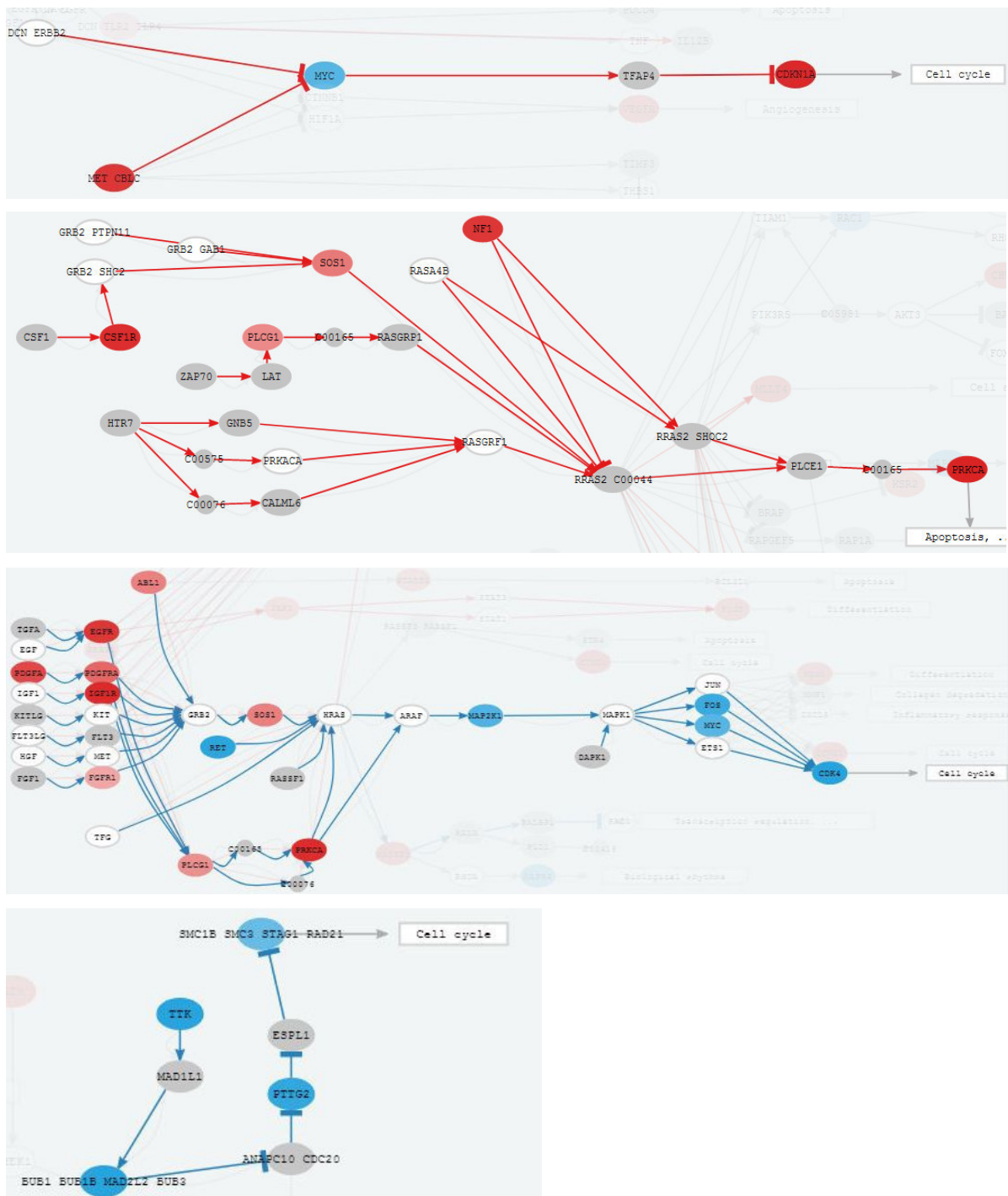


Figura 26. Circuitos de señalización visualizados ciclo celular con Hipathia. Color rojo muestra circuitos activos y color azul circuitos “apagados”. Lo nodos grises representan genes de los que no disponemos de información.

El ciclo celular, es solo una de las vías que se encuentra alterada en este grupo de muestras. Actualmente nos encontramos analizando e interpretando el resto de resultados teniendo en cuenta la limitación de la información al ser un panel dirigido.

DISCUSIÓN

Aproximadamente el 20% de las NNEs son clasificadas como CNE, y la mayoría de estos pacientes presentan una enfermedad metastásica e irresecable en el momento del diagnóstico. Aquellos pacientes que no son susceptibles de recibir tratamiento, muestran una enfermedad muy agresiva y con una progresión de la enfermedad muy rápida (7,68), reflejándose en una pobre supervivencia (4-6 meses). Incluso en aquellos pacientes que reciben tratamiento el rango de SG es únicamente de 8 a 20 meses (9). Este escenario nos muestra la necesidad de buscar nuevas opciones terapéuticas, así como de identificar nuevos marcadores o dianas que mejoren los ratios de supervivencia en estos pacientes.

Tanto a nivel clínico como histológico, los CNEs son muy parecidos a los CPCP, esto ha llevado a lo largo del tiempo a aceptar que la terapia estándar usada para este grupo fuese también aplicada en CNEs, es decir, primera línea de tratamiento un régimen basado en platinos (19,69,70). Ya se ha demostrado que la combinación de cisplatino y etopósido tiene una mayor respuesta, aunque es cierto que tanto la SLP como la SG siguen siendo muy bajas (17,71). En el caso concreto de pulmón, el CNCG presenta características clinicopatológicas y biológicas complejas que dificulta bastante poder definir un régimen de quimioterapia óptimo (72). Varios estudios afirman que este tipo de CNE debería seguir tratándose como el CPCP (73,74), pero otros plantean la opción de tratarlo como al resto de carcinomas de pulmón no-microcítico (75). Es decir, no hay un criterio definido para el manejo del paciente con CNE y la única terapia consensuada no es efectiva durante mucho tiempo.

5.1 Origen neuroendocrino de las líneas NCI-H460 Y COLO320 HDR

Antes de profundizar en una discusión sobre los resultados obtenidos en este trabajo, es importante destacar que la línea COLO320 ha sido descrita anteriormente como un adenocarcinoma mixto. Sin embargo, existen varios estudios en los que utilizan esta línea como un CNE. Quinn *et al.* ya describieron que la línea COLO320 presentaba un origen neuroendocrino y no adenoepitelial colónico (54). Posteriormente, Sunday *et al.* publicaron un estudio basado en la línea COLO320 en el cual fue descrita como un carcinoma neuroendocrino humano (76). En lo que respecta a la línea H460, está descrita como un carcinoma de célula grande de pulmón, pero no está demás señalar que varias publicaciones resaltan sus características de tumor neuroendocrino pobremente diferenciado (77,78). Hasta donde sabemos, ninguno de los estudios en los que se emplean modelos de xenoinjerto con estas líneas celulares han evaluado la tasa de proliferación (% ki67 o tasa mitótica), el patrón de necrosis o marcadores subrogados como la expresión de p53 en los tumores generados para confirmar, si durante el desarrollo, estos tumores mantienen las características asociadas al origen neuroendocrino de las líneas de las que se han derivado.

Por ello, lo primero que hicimos en este estudio fue caracterizar los tumores generados en los modelos de xenoinjerto derivados de la línea H460 y COLO320 mediante inmunohistoquímica, evaluación de necrosis y evaluación del índice de proliferación. Los resultados confirmaron que estos tumores mantenían las características asociadas a los CNEs hasta el final del estudio. Creemos que esta validación es fundamental para interpretar los resultados posteriormente obtenidos en este estudio y para futuros estudios in vivo en los que se utilicen estas dos líneas celulares.

5.2 Actividad antitumoral generada por el efecto de los tratamientos anti-VEGF

Volviendo a las NNEs y haciendo referencia a lo ya descrito anteriormente, la situación real de estos pacientes ha ido cambiando en la últimas dos décadas. Las dificultades para conseguir información a nivel prospectivo, y la baja frecuencia de estos tumores, dificultan mucho la realización de estudios clínicos que nos permitan evaluar nuevas terapias que podrían aumentar la SG de estos pacientes. En este punto, para poder evaluar nuevos agentes anticancerígenos, emergen como un nuevo enfoque los modelos de xenoinjerto generados a partir de líneas celulares o tumores humanos. Por tanto esta es la aproximación que nosotros hemos seguido.

Aunque los CNEs presentan menos vasos que los TNE, poseen una alta actividad proliferativa y una alta expresión de moléculas proangiogénicas (25). De hecho, desde los primeros estudios sobre la vía VEGF, este factor se ha considerado como un marcador pronóstico muy importante en este tipo de tumores (79). Por lo tanto, se podría esperar que las terapias antiangiogénicas, dirigidas contra los miembros de la familia VEGF, fueran más efectivas en los CNEs. En este contexto y con todo esto en mente, diseñamos un estudio preclínico, para evaluar si la interferencia en la señalización de VEGF, mediante el uso de dos terapias antiangiogénicas diferentes (aflibercept y bevacizumab), podría tener un efecto antitumoral en los CNEs generados mediante modelos de xenoinjerto.

Los resultados derivados de este estudio mostraron que ambas terapias presentan una elevada actividad antitumoral (más del 70%) en ambos modelos, gastrointestinal y pulmonar. Siendo especialmente llamativo en el modelo de CNCG de pulmón tratado con aflibercept donde se observó un 94% de actividad antitumoral. Más aún el 66% de estos tumores mostraron una parada del crecimiento tumoral. Este resultado apunta hacia un nuevo enfoque terapéutico nunca antes planteado para este tipo de tumores.

Para poder abordar la cinética de crecimiento tumoral de una manera comparable a los métodos utilizados en estudios clínicos utilizamos una herramienta publicada recientemente, Tumor Control Index (TCI) (57). Este TCI comprende medidas de inhibición, regresión y estabilidad tumoral, que nos proporciona una visión mucho más profunda del comportamiento de los fármacos. Nuestros

resultados muestran que la puntuación TCI para aflibercept y bevacizumab fue estadísticamente significativa en ambos modelos de CNE y confirman que aflibercept ejerce un mayor efecto de inhibición tumoral en los CNCG de pulmón que bevacizumab. Si únicamente nos centramos en la estabilidad del tumor, ambos tratamientos son capaces de estabilizar el desarrollo tumoral tanto en el modelo de xenoinjerto de CNE gastrointestinal como en el modelo de CNCG de pulmón.

La actividad anticancerígena inicial de los fármacos anti-VEGF radica en su capacidad para estabilizar los vasos sanguíneos del tumor, lo que permite que el quimioterápico con el que va en combinación consiga alcanzar al tumor. El tratamiento con bevacizumab es utilizado comúnmente en combinación con drogas basadas en platino en varios tumores, como el cáncer de pulmón no microcíticos o el carcinoma de colon. Pero esta combinación también ha mostrado eficacia terapéutica en el CPCP quimiorresistente y recidivante (80), al igual que en CPCP con enfermedad extendida, donde mejora la SLP (81,82). Además, existen varios ensayos clínicos en los que han examinado la eficacia del bevacizumab en tumores neuroendocrinos bien diferenciados observando una actividad antitumoral moderada (14,33). En lo que respecta a los CNEs y su relación con la terapia anti-VEGF, hasta el momento existen tres modelos de xenoinjerto derivados de líneas celulares de CNE en los que se ha evaluado la eficacia de bevacizumab. En uno de estos estudios se evaluó la toxicidad y la eficacia de la radioinmunoterapia (RIT) combinada con bevacizumab en ratones a los que se les inyectó de forma subcutánea células de carcinoma medular de tiroides y donde los autores observaron que el tratamiento previo con bevacizumab mejoraba la eficacia de la RIT con una toxicidad similar a la observada usando solamente RIT (83). Por otro lado, Kasuya et al. llevaron a cabo un estudio para evaluar el efecto antitumoral del bevacizumab utilizando líneas celulares de CNE pancreático en comparación con dos líneas celulares de carcinoma ductal de páncreas. Estos autores observaron que el bevacizumab ejercía un mayor efecto en la inhibición del crecimiento en las líneas de CNE que en las de adenocarcinoma ductal y concluyeron que bevacizumab podría tener un gran efecto inhibitorio en el crecimiento de CNEs pancreáticos (84). Posteriormente, estos mismos autores compararon, en otro estudio, el efecto del bevacizumab en terapia combinada con gemcitabina *versus* bevacizumab en monoterapia. Este estudio concluyó que la gemcitabina podría ser un fármaco apropiado para utilizarlo en combinación con bevacizumab en CNEs pancreáticos (85). Además de estos estudios preclínicos, el beneficio de este antiangiogénico también se ha demostrado en casos puntuales de paciente diagnosticados con algún CNE concreto. En combinación con FOLFOX6 modificado (86) o temozolamida (68) o en monoterapia en un paciente con un carcinoma de iris que había metastatizado a partir de un CNCG de pulmón (87). Estos estudios apoyan nuestros resultados y refuerzan la idea de utilizar antiangiogénicos como posible terapia para los CNE (45). Hasta el momento, solo hay un estudio

clínico fase II diseñado para evaluar la eficacia de bevacizumab. Este estudio (PRODIGE 41-BEVANEC) incluye pacientes con CNEs gastroenteropancreáticos y con progresión de la enfermedad documentada durante o después de recibir cisplatino-etopósido como quimioterapia paliativa en primera línea. La hipótesis es demostrar una SG de 6 meses para al menos el 50% de los pacientes en el brazo de bevacizumab más FOLFIRI frente al 35% en el brazo control (solo FOLFIRI). El primer paciente fue asignado al azar en septiembre de 2017 y el estudio sigue abierto actualmente (28). Hasta la fecha no hemos encontrado ningún estudio preclínico, previo al nuestro, en el que se haya evaluado bevacizumab en CNEs gastrointestinales. La significativa actividad antitumoral de bevacizumab observada en los tumores derivados de la línea COLO320 apoya la hipótesis planteada en PRODIGE 41-BEVANEC y esperamos que los resultados sean tan positivos como los que hemos encontrado en el modelo preclínico. Por otro lado, es importante mencionar que hasta el momento de cerrar nuestro estudio no había ningún otro estudio publicado en el que se evaluase el efecto de aflibercept en CNEs. Por tanto, se trata del primer estudio preclínico realizado del que se obtienen unas conclusiones sólidas relacionadas con un nuevo enfoque terapéutico para los CNEs. Los resultados derivados de nuestro estudio indican un punto de partida para el diseño de nuevos estudios, similares al PRODIGE 41-BEVANEC, para los CNEs. Las diferencias en la actividad antitumoral mostrada entre los tumores derivados de la línea H460 y los de la línea COLO320 nos indicaban que era poco probable que se debiese únicamente a la disminución de los niveles de los miembros de la familia VEGF, ya que ambos modelos de xenoinjerto mostraban reducciones similares. Esto nos llevó a evaluar posibles mecanismos de acción adicionales a los tradicionalmente publicados.

5.3 Efecto antitumoral de aflibercept dependiente de galectina-1

Durante el desarrollo de este trabajo realizamos una búsqueda bibliográfica con el fin de encontrar alguna evidencia que nos ayudase a explicar el mayor efecto de aflibercept en el modelo de CNCG de pulmón. Siguiendo esta línea encontramos que Kanda A. *et al* demostraron la eficacia de neutralización de aflibercept sobre la galectina-1 (Gal-1) (58). Dada la relevancia de galectina-1 en múltiples etapas de la carcinogénesis, este estudio nos sugirió un posible mecanismo molecular para nuestro modelo.

La Gal-1 está definida como una proteína de unión β -galactósida de la familia de las lectinas (88), posee una estructura específica con un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) gracias al cual es capaz de homodimerizar y generar una subunidad de 14,5 KDa. Esta proteína se localiza tanto a nivel nuclear como citoplasmático y es exportada al espacio extracelular mediante una translocación directa a través de la membrana plasmática (89,90). Participa en múltiples funciones

relacionadas con cáncer: permite escapar del sistema inmune, crear vasos nuevos – angiogénesis – y migrar para formar metástasis (91).

Galectina-1 se encuentra sobreexpresada en múltiples tumores y su expresión se ha correlacionado con la agresividad tumoral indicando que esta proteína puede modular la progresión del tumor e influir en el desarrollo de la enfermedad (92,93). Por este motivo, esta proteína se ha convertido en un blanco terapéutico prometedor en el que se está basando una parte importante de la investigación oncológica.

En nuestro trabajo demostramos que la unión de aflibercept a Gal-1 podría explicar la diferencia en el efecto antitumoral que observamos entre los CNEs de pulmón y los gastrointestinales. El modelo de xenoinjerto H460, mostró altos niveles de Gal-1 y el tratamiento con aflibercept redujo significativamente dichos niveles. Sin embargo, en el modelo de COLO320 los niveles observados de Gal-1 fueron apenas detectables y por tanto no se produjeron cambios significativos cuando estos tumores se trataron con aflibercept.

Una de las principales características de la Gal-1 es su actividad proangiogénica. En el microambiente tumoral, la Gal-1 se encuentra abundantemente expresada tanto en las células endoteliales como en las células tumorales (94). De hecho, los altos niveles de Gal-1 extracelular producidos por la célula tumoral tienen un mayor impacto en la angiogénesis que la propia Gal-1 producida por las células endoteliales. Son necesarios varios pasos para que se lleve a cabo la neovascularización, uno de ellos es la desestabilización de la membrana basal y de la matriz extracelular (MEC) mediado por las metaloproteinasas (MMP). La Gal-1 influye a nivel estructural reforzando y estabilizando las conexiones entre las células endoteliales vasculares y las interacciones de la MEC. Además, la neuropilina-1 (NRP-1) (co-receptor transmembrana de VEGFR) actúa como diana para Gal-1. La unión de Gal-1 a NRP-1 induce la fosforilación de VEGFR-2 independiente de unión a ligando y media la migración y adhesión de las células endoteliales (60). Nuestros resultados van en consonancia con estas observaciones; los tumores del modelo de CNCG de pulmón, tratados con aflibercept, redujeron significativamente los niveles de Gal-1 pero también los niveles de VEGFR-2 fosforilados, probablemente debido a los bajos niveles de Gal-1 disponibles para unirse a la NRP-1. Estos mismos tumores mostraron una disminución significativa de la proteína MMP2, enzima responsable de la degradación del componente principal de la membrana basal (colágeno tipo IV) necesaria para la remodelación de la MEC. Estudios recientes han demostrado que la Gal-1 estimula la motilidad celular al disminuir la expresión de genes específicos del colágeno (COL3A1 y COL5A1) y aumentar los niveles de MMP-2 (61). En nuestro trabajo también observamos una sobreexpresión de los genes *COL3A1* y *COL5A1* en los CNCG de pulmón

tratados con aflibercept. Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la disminución de Gal-1 por aflibercept afectaría negativamente tanto a la neovascularización, debido a la disminución de los niveles de fosforilación de VEGFR2, como a la desestabilización de la membrana basal y la MEC, debido a la disminución de los niveles de MMP2 y el aumento de los colágenos 3A1 y 5A1.

La transición epitelio-mesénquima (TEM), junto con la neoangiogénesis y los cambios en la interacción célula-célula o célula-matriz, es un proceso esencial durante la progresión del cáncer. La TEM es un proceso reversible regulado por varios biomarcadores, los cuales han sido identificados en muchos tumores como el cáncer de esófago (95), el de ovario (96) o el cáncer de mama (97), así como en los tumores neuroendocrinos pulmonares (98) y gastrointestinales (99). Varios autores ya han descrito como el aumento de la expresión de Gal-1 induce la TEM modulando la expresión de E-cadherina e induciendo la translocación de β -catenina en hepatocarcinomas y cáncer gástrico (100). En este último, se describe una correlación entre la expresión estable de Gal-1 y la reducción significativa de E-cadherina con un aumento de vimentina. Cuando bloquean Gal-1 observan un aumento de E-cadherina y una disminución significativa de la vimentina. Además, evaluaron por inmunohistoquímica estos mismos marcadores en 162 tejidos de cáncer gástrico y observaron que la expresión de Gal-1 y vimentina fue significativamente mayor y la de E-cadherina significativamente menor que en los tejidos sanos de los mismos pacientes. En nuestro estudio, los tumores del modelo de CNCG de pulmón con elevada expresión de Gal-1 (grupo control y grupo tratado con bevacizumab) mostraron una disminución de los niveles de E-cadherina en la membrana celular al igual que una expresión citoplasmática de β -catenina. Sin embargo, los tumores tratados con aflibercept, con niveles significativamente reducidos de Gal-1, mostraron una mayor expresión de E-cadherina y una localización de membrana de β -catenina, indicando un aumento del complejo E-cadherina / β -catenina en la membrana citoplasmática asociada con la integridad del epitelio y previniendo la progresión tumoral. Uno de los factores de transcripción más importantes en la TEM es Snail como represor clave de E-cadherina (98). Bacigalupo *et al.* describieron que Gal-1 induce la TEM, en parte, modulando la expresión de E-cadherina dependiente de Snail (100). Teniendo en cuenta esto, en nuestro estudio observamos que los tumores tratados con aflibercept, y que presentan niveles significativamente más altos de E-cadherina que los controles o los tratados con bevacizumab, mostraron una reducción significativa en la expresión de Snail.

Los fibroblastos asociados a cáncer (FACs) también son participantes activos no solo en el reclutamiento de las células endoteliales durante la angiogénesis y en las interacciones célula-célula sino que también están relacionados con las células inflamatorias, con el sistema inmune y con la

modulación de la MEC mediante señalización paracrina/exocrina (101). Se ha demostrado que parte del papel que los FACs tienen en el proceso de angiogénesis es a través de galectina-1 (66). Gal-1 se encuentra altamente expresada en los FACs y está directamente relacionada con la activación de estos fibroblastos a través de la regulación de la expresión de la proteína α -sma (67) y de Snail (102). En nuestro estudio, al reducir Gal-1 por acción de aflibercept observamos que la expresión de Snail se reduce en los tumores del modelo de CNCG de pulmón al igual que la expresión de la proteína α -sma. Ya que ambas proteínas desempeñan un papel fundamental en la activación de los FACs observamos una pérdida de las características de activación que resulta en la disminución en el número de estos fibroblastos.

En relación con el papel fundamental que tiene Gal-1 en la activación de los fibroblastos y esto a su vez en el microambiente tumoral, investigadores españoles han descrito recientemente la importancia de deplecionar Gal-1 en adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) (103). Los ADPs se desarrollan en un microambiente tumoral singular gran responsable del desarrollo de estos tumores y de su resistencia a las quimioterapias convencionales, así como de la falta de éxito de nuevos tratamientos. Dentro de este entorno los fibroblastos producen grandes cantidades de Gal-1. Estos autores demuestran como la supresión genética de Gal-1 disminuye la activación del estroma, atenua la vascularización y mejora la infiltración de células T en un modelo de ratón de ADP. Todo esto llevó a una disminución de las tasas de metástasis y un aumento significativo de la supervivencia en estos ratones.

5.4 Galectina-1 como marcador de respuesta en CNEs

Tanto nuestros resultados como los mencionados previamente apoyan que la neutralización de Gal-1 a través de aflibercept podría prevenir la invasión y progresión tumoral inhibiendo la TEM, la remodelación de la matriz y la neoangiogénesis en los CNCG de pulmón. El aumento de la expresión de Gal-1 se ha asociado con el desarrollo de metástasis en cáncer de páncreas (104), melanoma (105), carcinoma de pulmón (106,107), sarcoma de Kaposi (108), carcinoma de mama (109), carcinoma de próstata (110) y en carcinoma hepatocelular (100). Ahora, los carcinomas neuroendocrinos representan otro tipo de tumor Gal-1-dependiente. El hecho de que los CNE de colon mostrasen niveles mínimos de esta proteína y por tanto un menor efecto antitumoral de aflibercept indica la necesidad de determinar el nivel de Gal-1 en aquellos pacientes con CNE para poder discriminar quiénes podrían obtener un mayor beneficio de este tratamiento. En nuestro trabajo analizamos la expresión de Gal-1 en un pequeño grupo de pacientes con CNE y confirmamos que los pacientes con CNE de colon no mostraron diferencias significativas de expresión de *LGALS1* entre el tumor y el tejido normal. Sin embargo los CNE de pulmón y de

páncreas presentaron niveles significativamente más altos de *LGALS1* en los tejidos tumorales que en sus correspondientes tejidos sanos. Estos resultados indican que, además de los CNCG de pulmón, al menos los CNE de páncreas también podrían beneficiarse de esta terapia apoyando los datos publicados por Orozco et al. en adenocarcinoma de páncreas (103). Este estudio destacó en sus conclusiones el amplio potencial terapéutico de los inhibidores específicos de Gal-1. Sería muy interesante hacer un cribado en el resto de CNEs para conocer cuáles de ellos presentan niveles altos de Gal-1. Nuestros resultados confirman que aflibercept podría ser tan bueno como los inhibidores específicos de Gal-1, ya que este fármaco muestra una alta afinidad por galectina-1. Además, supone una nueva opción terapéutica para los CNE abriendo la posibilidad de diseñar nuevos ensayos clínicos con Gal-1 como marcador predictivo para estos pacientes.

5.5 Perfiles de expresión génica, nuevas rutas moduladas por antiangiogénicos

El estudio de perfiles de expresión génica y los nuevos avances en secuenciación, abren la puerta a la identificación de nuevas dianas terapéuticas y nos permitan seleccionar aquellos pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de un tratamiento dirigido. En nuestro estudio decidimos ampliar la búsqueda de nuevos mecanismos moleculares asociados a bevacizumab o aflibercept. Para ello realizamos un perfil de expresión génica utilizando un panel dirigido formado por 1.385 genes relacionados con cáncer. En primer lugar realizamos un análisis de enriquecimiento con las bases de datos GO y KEGG, para identificar posibles procesos biológicos y vías de señalización que estén siendo alterados por nuestros tratamientos. Grosso modo encontramos procesos y vías que podrían estar relacionados con la sensibilidad a dichos fármacos como regulación negativa del ciclo celular, conformación de la estructura del ADN, procesos de corte y empalme del ARN, replicación y reparación del ADN..., pero también algunas que potencialmente podrían estar asociadas con mecanismos de resistencia como por ejemplo migración y motilidad celular, uniones célula-célula, endocitosis o resistencia a diferentes fármacos usados de forma estándar. En cualquier caso, es importante resaltar que los análisis de enriquecimiento sólo te informan de que un número de genes sobreexpresados o infraexpresados relacionados con ese proceso o vía están significativamente agrupados pero no indican el efecto biológico que eso pueda tener. Para responder a esa pregunta es fundamental validar esos resultados a nivel de proteínas e integrar dichos resultados.

Para tener una mejor idea de cómo la desregulación de estos genes podría tener una consecuencia funcional realizamos un segundo análisis que estima como de afectada está la señal que se transmite de un gen a otro para terminar activando o inhibiendo un circuito concreto. El análisis de estos datos es un proceso complejo que requiere de un abordaje multidisciplinar que permita

integrar de forma correcta todos los resultados. Nosotros hemos comenzado el análisis centrándonos en el grupo tratado con aflibercept dentro del modelo de CNCG de pulmón. Integrando parte de los resultados obtenidos hemos identificado el ciclo celular como vía de señalización alterada por aflibercept a diferentes niveles. *CDKN1A* (p21) se encuentra activado, esta proteína es un inhibidor de ciclo celular que actúa directamente sobre la actividad de *CDK4* que por otra parte se encuentra “apagado”. También se encuentra activado *PRKCA*, que a pesar de tener un papel protumorigénico también puede ejercer un papel supresor. De hecho se ha descrito que la activación de *PKCα* (*PRKCA*) en tumores no microcíticos activa a p21 y por tanto favorece la inhibición del ciclo celular (111). Además de *CDK4*, también se encuentra apagada la vía de *RAD21*, *STAG1*, *SMC3*, *SMC1B*, todos ellos con funciones claves en la progresión del ciclo celular. El hecho de encontrar que aflibercept disminuye la expresión de *RAD21* es un dato que puede ser muy positivo a la hora de plantear una combinación con la terapia estándar de los CNEs (platino + etopósido) ya que hay un estudio en cáncer de mama donde describen que la inhibición de *RAD21* aumenta la citotoxicidad del etopósido (112). Si tomamos todas estas vías activadas y apagadas conjuntamente podemos concluir que aflibercept en el modelo de CNCG de pulmón afecta de forma negativa al funcionamiento del ciclo celular. Este supuesto se ve apoyado por la reducción significativa del marcador de proliferación Ki67 en los tumores tratados con aflibercept (29%) comparado con los tumores control ($p < 0,03$).

De nuevo es importante remarcar que estos resultados deben ser validados a nivel de proteína para ser correctamente interpretados. Por ejemplo, dentro de las vías de señalización activadas se encuentra la de *VEGFA*. Este resultado nos estaría indicando un mecanismo de resistencia al tratamiento con antiangiogénicos. Sin embargo, por nuestros resultados de ELISA sabemos que los niveles de la proteína *VEGFA* están significativamente reducidos y por tanto el aumento de expresión génica de *VEGFA* observado y utilizado por Hipathia para mostrar una vía activa no es real ya que ese aumento de ARNm no se correlaciona con los niveles de proteína. Este sería un claro ejemplo de que las interpretaciones basadas en los niveles de ARNm hay que validarlas obligatoriamente a nivel de proteína para poder confirmar los resultados.

CONCLUSIONES

- 1- La evaluación *in vivo* de las terapias anti-VEGF, aflibercept y bevacizumab, confirmó una significativa actividad antitumoral de ambos fármacos en los dos modelos murinos de carcinoma neuroendocrino. Observando un mayor efecto de aflibercept en el modelo de carcinoma neuroendocrino de célula grande de pulmón.
- 2- En este modelo de pulmón, aflibercept no solo presenta una elevada actividad antitumoral sino que también induce una parada completa del crecimiento tumoral y una mayor capacidad de estabilización tumoral.
- 3- En el modelo de CNE de colon, ambos fármacos mostraron una actividad antitumoral similar indicando que cualquiera de las dos terapias es efectiva en este tipo de carcinoma neuroendocrino.
- 4- Las diferencias observadas en el efecto inhibitorio de aflibercept entre ambos modelos son debidas, al menos parcialmente, a los niveles de galectina-1 que muestran dichos tumores.
- 5- Los tumores derivados del modelo de carcinoma neuroendocrino de célula grande de pulmón mostraron niveles significativamente más elevados de galectina-1 a nivel epitelial, estromal y extracelular con respecto al modelo de CNE de colon tanto a nivel de proteína como de ARNm.
- 6- La disminución de los niveles de galectina-1 por aflibercept en el modelo de pulmón se relacionó con la disminución de la angiogénesis, la inhibición de la motilidad celular y remodelación de la matriz extracelular, y con la inhibición de la transición epitelio-mesénquima.
- 7- Aflibercept tiene un mecanismo de acción dependiente de galectina-1 más allá de su mecanismo tradicionalmente descrito.
- 8- EL nivel de expresión de Gal-1 en pacientes con CNE debería evaluarse como potencial marcador predictivo de la respuesta a aflibercept en estos pacientes.
- 9- El análisis transcriptómico muestra de forma preliminar que tanto aflibercept como bevacizumab modulan procesos biológicos y vías de señalización relevantes para el mantenimiento de la estructura de ADN, procesamientos de corte y empalme de ARN, y ciclo celular entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

1. GETNE – Grupo Español de Tumores Neuroendocrinos y Endocrinos [Internet]. [cited 2018 Sep 11]. Available from: <http://getne.org/>
2. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, et al. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017 Oct 1;3(10):1335–42.
3. Tumores neuroendocrinos [Internet]. [cited 2018 Sep 11]. Available from: <https://www.seom.org/es/info-sobre-el-cancer/tumor-neuroendocrino?showall=1>
4. Frilling A, Akerström G, Falconi M, Pavel M, Ramos J, Kidd M, et al. Neuroendocrine tumor disease: an evolving landscape. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Oct;19(5):R163-185.
5. Heetfeld M, Chougnat CN, Olsen IH, Rinke A, Borbath I, Crespo G, et al. Characteristics and treatment of patients with G3 gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Aug;22(4):657–64.
6. Oronsky B, Ma PC, Morgensztern D, Carter CA. Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas. *Neoplasia N Y N*. 2017 Dec;19(12):991–1002.
7. Garcia-Carbonero R, Sorbye H, Baudin E, Raymond E, Wiedenmann B, Niederle B, et al. ENETS Consensus Guidelines for High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Neuroendocrine Carcinomas. *Neuroendocrinology*. 2016;103(2):186–94.
8. Öberg K, Hellman P, Ferolla P, Papotti M, ESMO Guidelines Working Group. Neuroendocrine bronchial and thymic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2012 Oct;23 Suppl 7:vii120-123.
9. Eads JR. Poorly Differentiated Neuroendocrine Tumors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016 Feb;30(1):151–62.
10. Grozinsky-Glasberg S, Shimon I, Rubinfeld H. The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*. 2012;96(3):173–87.
11. Rinke A, Müller H-H, Schade-Brittinger C, Klose K-J, Barth P, Wied M, et al. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4656–63.
12. Caplin ME, Pavel M, Ruzsniowski P. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2014 Oct 16;371(16):1556–7.
13. Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, Hendifar A, Yao J, Chasen B, et al. Phase 3 Trial of 177Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med*. 2017 12;376(2):125–35.
14. Yao JC, Guthrie KA, Moran C, Strosberg JR, Kulke MH, Chan JA, et al. Phase III Prospective Randomized Comparison Trial of Depot Octreotide Plus Interferon Alfa-2b Versus Depot Octreotide Plus Bevacizumab in Patients With Advanced Carcinoid Tumors: SWOG S0518. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 May 20;35(15):1695–703.
15. Yao JC, Pavel M, Lombard-Bohas C, Van Cutsem E, Voi M, Brandt U, et al. Everolimus for the Treatment of Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Overall Survival and Circulating

- Biomarkers From the Randomized, Phase III RADIANT-3 Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 Nov 10;34(32):3906–13.
16. Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, et al. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Lond Engl*. 2016 Mar 5;387(10022):968–77.
 17. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013 Jan;24(1):152–60.
 18. Vélayoudom-Céphise F-L, Duvillard P, Foucan L, Hadoux J, Chougnet CN, Leboulleux S, et al. Are G3 ENETS neuroendocrine neoplasms heterogeneous? *Endocr Relat Cancer*. 2013 Oct;20(5):649–57.
 19. Yamaguchi T, Machida N, Morizane C, Kasuga A, Takahashi H, Sudo K, et al. Multicenter retrospective analysis of systemic chemotherapy for advanced neuroendocrine carcinoma of the digestive system. *Cancer Sci*. 2014 Sep;105(9):1176–81.
 20. Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J. Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer*. 1991 Jul 15;68(2):227–32.
 21. Sorbye H, Strosberg J, Baudin E, Klimstra DS, Yao JC. Gastroenteropancreatic high-grade neuroendocrine carcinoma. *Cancer*. 2014 Sep 15;120(18):2814–23.
 22. Hadoux J, Malka D, Planchard D, Scoazec JY, Caramella C, Guigay J, et al. Post-first-line FOLFOX chemotherapy for grade 3 neuroendocrine carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Jun;22(3):289–98.
 23. Hentic O, Hammel P, Couvelard A, Rebours V, Zappa M, Palazzo M, et al. FOLFIRI regimen: an effective second-line chemotherapy after failure of etoposide-platinum combination in patients with neuroendocrine carcinomas grade 3. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Dec;19(6):751–7.
 24. Olsen IH, Sørensen JB, Federspiel B, Kjaer A, Hansen CP, Knigge U, et al. Temozolomide as second or third line treatment of patients with neuroendocrine carcinomas. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:170496.
 25. Yazdani S, Kasajima A, Tamaki K, Nakamura Y, Fujishima F, Ohtsuka H, et al. Angiogenesis and vascular maturation in neuroendocrine tumors. *Hum Pathol*. 2014 Apr;45(4):866–74.
 26. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer*. 2013 Dec;13(12):871–82.
 27. Naik A, Al-Zeheimi N, Bakheit CS, Al Riyami M, Al Jarrah A, Al Moundhri MS, et al. Neuropilin-1 Associated Molecules in the Blood Distinguish Poor Prognosis Breast Cancer: A Cross-Sectional Study. *Sci Rep*. 2017 Jun 12;7(1):3301.
 28. Walter T, Malka D, Hentic O, Lombard-Bohas C, Le Malicot K, Smith D, et al. Evaluating bevacizumab in combination with FOLFIRI after the failure of platinum-etoposide regimen in

- patients with advanced poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: The PRODIGE 41-BEVANEC randomized phase II study. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2018 Feb;50(2):195–8.
29. Kakuta S, Takayama W, Kou T, Satou M, Sugaya M. [A Case of Descending Colon Adenocarcinoma with Neuroendocrine Differentiation Successfully Treated with FOLFIRI plus Bevacizumab]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2016 Jan;43(1):129–32.
 30. Bendell JC, Zakari A, Lang E, Waterhouse D, Flora D, Alguire K, et al. A Phase II Study of the Combination of Bevacizumab, Pertuzumab, and Octreotide LAR for Patients with Advanced Neuroendocrine Cancers. *Cancer Invest*. 2016 May 27;34(5):213–9.
 31. Yao JC, Phan A, Hoff PM, Chen HX, Charnsangavej C, Yeung S-CJ, et al. Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment phase II study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon alpha-2b. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1316–23.
 32. Kunz PL, Balise RR, Fehrenbacher L, Pan M, Venook AP, Fisher GA, et al. Oxaliplatin-Fluoropyrimidine Chemotherapy Plus Bevacizumab in Advanced Neuroendocrine Tumors: An Analysis of 2 Phase II Trials. *Pancreas*. 2016 Nov;45(10):1394–400.
 33. Kulke MH, Niedzwiecki D, Foster NR, Fruth B, Kunz PL, Kennecke HF, et al. Randomized phase II study of everolimus (E) versus everolimus plus bevacizumab (E+B) in patients (Pts) with locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors (pNET), CALGB 80701 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015 May 20;33(15_suppl):4005–4005.
 34. Ricci V, Ronzoni M, Fabozzi T. Aflibercept a new target therapy in cancer treatment: a review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 Dec;96(3):569–76.
 35. Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T, Abe M, Ikezono Y, Wada F, et al. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Aflibercept, a Soluble VEGF Receptor-1 and -2, in a Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma. *Neoplasia N Y N*. 2016 Jul;18(7):413–24.
 36. Wu FTH, Paez-Ribes M, Xu P, Man S, Bogdanovic E, Thurston G, et al. Aflibercept and Ang1 supplementation improve neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in a preclinical model of resectable breast cancer. *Sci Rep*. 2016 14;6:36694.
 37. Kim ES, Serur A, Huang J, Manley CA, McCrudden KW, Frischer JS, et al. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 20;99(17):11399–404.
 38. Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, et al. Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Nov 15;9(15):5721–8.
 39. Fukasawa M, Korc M. Vascular endothelial growth factor-trap suppresses tumorigenicity of multiple pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 May 15;10(10):3327–32.
 40. Faivre S, Niccoli P, Castellano D, Valle JW, Hammel P, Raoul J-L, et al. Sunitinib in pancreatic neuroendocrine tumors: updated progression-free survival and final overall survival from a phase III randomized study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Feb 1;28(2):339–43.

41. Valle JW, Borbath I, Rosbrook B, Fernandez K, Raymond E. Sunitinib in patients with pancreatic neuroendocrine tumors: update of safety data. *Future Oncol Lond Engl*. 2019 Jan 31;
42. Castellano D, Capdevila J, Sastre J, Alonso V, Llanos M, García-Carbonero R, et al. Sorafenib and bevacizumab combination targeted therapy in advanced neuroendocrine tumour: a phase II study of Spanish Neuroendocrine Tumour Group (GETNE0801). *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2013 Dec;49(18):3780–7.
43. Grande E, Capdevila J, Castellano D, Teulé A, Durán I, Fuster J, et al. Pazopanib in pretreated advanced neuroendocrine tumors: a phase II, open-label trial of the Spanish Task Force Group for Neuroendocrine Tumors (GETNE). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015 Sep;26(9):1987–93.
44. Pellat A, Dreyer C, Couffignal C, Walter T, Lombard-Bohas C, Niccoli P, et al. Clinical and Biomarker Evaluations of Sunitinib in Patients with Grade 3 Digestive Neuroendocrine Neoplasms. *Neuroendocrinology*. 2018;107(1):24–31.
45. Mishima S, Kawazoe A, Matsumoto H, Kuboki Y, Bando H, Kojima T, et al. Efficacy and safety of ramucirumab-containing chemotherapy in patients with pretreated metastatic gastric neuroendocrine carcinoma. *ESMO Open*. 2018;3(7):e000443.
46. Girardi DM, Silva ACB, Rêgo JFM, Coudry RA, Riechelmann RP. Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017 May;56:28–35.
47. Oberg K, Modlin IM, De Herder W, Pavel M, Klimstra D, Frilling A, et al. Consensus on biomarkers for neuroendocrine tumour disease. *Lancet Oncol*. 2015 Sep;16(9):e435–46.
48. Meder L, König K, Ozretić L, Schultheis AM, Ueckerth F, Ade CP, et al. NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *Int J Cancer*. 2016 Feb 15;138(4):927–38.
49. Hijioka S, Hosoda W, Matsuo K, Ueno M, Furukawa M, Yoshitomi H, et al. Rb Loss and KRAS Mutation Are Predictors of the Response to Platinum-Based Chemotherapy in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm with Grade 3: A Japanese Multicenter Pancreatic NEN-G3 Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Aug 15;23(16):4625–32.
50. Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albini A, Bresaola E, Marchiò C, et al. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl Lung Cancer Res*. 2017 Oct;6(5):513–29.
51. Tang LH, Basturk O, Sue JJ, Klimstra DS. A Practical Approach to the Classification of WHO Grade 3 (G3) Well-differentiated Neuroendocrine Tumor (WD-NET) and Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinoma (PD-NEC) of the Pancreas. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(9):1192–202.
52. Cavalcanti E, Armentano R, Valentini AM, Chieppa M, Caruso ML. Role of PD-L1 expression as a biomarker for GEP neuroendocrine neoplasm grading. *Cell Death Dis*. 2017 24;8(8):e3004.
53. Aranda FI, Alenda C, Peiró FM, Peiró G. Tumores neuroendocrinos pulmonares. :17.

54. Quinn LA, Moore GE, Morgan RT, Woods LK. Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Res.* 1979 Dec;39(12):4914–24.
55. Li H, Takayama K, Wang S, Shiraishi Y, Gotanda K, Harada T, et al. Addition of bevacizumab enhances antitumor activity of erlotinib against non-small cell lung cancer xenografts depending on VEGF expression. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014 Dec;74(6):1297–305.
56. Lal D, Park JA, Demock K, Marinaro J, Perez AM, Lin M-H, et al. Aflibercept exerts antivasular effects and enhances levels of anthracycline chemotherapy in vivo in human acute myeloid leukemia models. *Mol Cancer Ther.* 2010 Oct;9(10):2737–51.
57. Corwin WL, Ebrahimi-Nik H, Floyd SM, Tavousi P, Mandoiu II, Srivastava PK. Tumor Control Index as a new tool to assess tumor growth in experimental animals. *J Immunol Methods.* 2017 Jun;445:71–6.
58. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Aflibercept Traps Galectin-1, an Angiogenic Factor Associated with Diabetic Retinopathy. *Sci Rep.* 2015 Dec 9;5:17946.
59. Compagno D, Jaworski FM, Gentilini L, Contrufo G, González Pérez I, Elola MT, et al. Galectins: major signaling modulators inside and outside the cell. *Curr Mol Med.* 2014;14(5):630–51.
60. Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, Wong TY, et al. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene.* 2008 Jun 12;27(26):3746–53.
61. Yun SP, Lee S-J, Jung YH, Han HJ. Galectin-1 stimulates motility of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by downregulation of smad2/3-dependent collagen 3/5 and upregulation of NF- κ B-dependent fibronectin/laminin 5 expression. *Cell Death Dis.* 2014 Feb 6;5:e1049.
62. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1429–37.
63. Wanami LS, Chen H-Y, Peir S, de Herreros AG, Bachelder RE. Vascular Endothelial Growth Factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: Implications for tumor progression. *Exp Cell Res.* 2008 Aug 1;314(13):2448–53.
64. Dvořánková B, Szabo P, Lacina L, Gal P, Uhrova J, Zima T, et al. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs.* 2011;194(6):469–80.
65. Chong Y, Tang D, Xiong Q, Jiang X, Xu C, Huang Y, et al. Galectin-1 from cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition through β 1 integrin-mediated upregulation of Gli1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2016 Nov 11;35(1):175.
66. Tang D, Gao J, Wang S, Ye N, Chong Y, Huang Y, et al. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2016 Feb;37(2):1889–99.

67. Zheng L, Xu C, Guan Z, Su X, Xu Z, Cao J, et al. Galectin-1 mediates TGF- β -induced transformation from normal fibroblasts into carcinoma-associated fibroblasts and promotes tumor progression in gastric cancer. *Am J Transl Res*. 2016;8(4):1641–58.
68. Welin S, Sorbye H, Sebjornsen S, Knappskog S, Busch C, Oberg K. Clinical effect of temozolomide-based chemotherapy in poorly differentiated endocrine carcinoma after progression on first-line chemotherapy. *Cancer*. 2011 Oct 15;117(20):4617–22.
69. Terashima T, Morizane C, Hiraoka N, Tsuda H, Tamura T, Shimada Y, et al. Comparison of chemotherapeutic treatment outcomes of advanced extrapulmonary neuroendocrine carcinomas and advanced small-cell lung carcinoma. *Neuroendocrinology*. 2012;96(4):324–32.
70. Iwasa S, Morizane C, Okusaka T, Ueno H, Ikeda M, Kondo S, et al. Cisplatin and etoposide as first-line chemotherapy for poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of the hepatobiliary tract and pancreas. *Jpn J Clin Oncol*. 2010 Apr;40(4):313–8.
71. Hainsworth JD, Spigel DR, Litchy S, Greco FA. Phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and etoposide in advanced poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: a Minnie Pearl Cancer Research Network Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Aug 1;24(22):3548–54.
72. Iyoda A, Makino T, Koezuka S, Otsuka H, Hata Y. Treatment options for patients with large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Jun;62(6):351–6.
73. Sun J-M, Ahn M-J, Ahn JS, Um S-W, Kim H, Kim HK, et al. Chemotherapy for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma: similar to that for small cell lung cancer or non-small cell lung cancer? *Lung Cancer Amst Neth*. 2012 Aug;77(2):365–70.
74. Han K, Yang H, Fan L, Zhao H. Outcomes of patients with large cell neuroendocrine carcinoma of the lung after complete resection. *Transl Cancer Res*. 2017 Jun 9;6(3):483–92.
75. Varlotto JM, Medford-Davis LN, Recht A, Flickinger JC, Schaefer E, Zander DS, et al. Should large cell neuroendocrine lung carcinoma be classified and treated as a small cell lung cancer or with other large cell carcinomas? *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2011 Jun;6(6):1050–8.
76. Sunday ME, Isselbacher KJ, Gattioni-Celli S, Willett CG. Altered growth of a human neuroendocrine carcinoma line after transfection of a major histocompatibility complex class I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jun;86(12):4700–4.
77. Zhao Y, Yu D, Wu H, Liu H, Zhou H, Gu R, et al. Anticancer activity of SAHA, a potent histone deacetylase inhibitor, in NCI-H460 human large-cell lung carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 2014 Feb;44(2):451–8.
78. Piao Y, Guo H, Qu Z, Zheng B, Gao Y. CD146 promotes migration and proliferation in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma cell lines. *Oncol Lett*. 2019 Feb;17(2):2075–80.
79. Abdel-Rahman O. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway and neuroendocrine neoplasms (NENs): prognostic and therapeutic considerations. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2014 Nov;35(11):10615–25.

80. Lu H, Jiang Z. Advances in antiangiogenic treatment of small-cell lung cancer. *OncoTargets Ther.* 2017;10:353–9.
81. Tiseo M, Boni L, Ambrosio F, Camerini A, Baldini E, Cinieri S, et al. Italian, Multicenter, Phase III, Randomized Study of Cisplatin Plus Etoposide With or Without Bevacizumab as First-Line Treatment in Extensive-Disease Small-Cell Lung Cancer: The GOIRC-AIFA FARM6PMFJM Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2017 Apr 20;35(12):1281–7.
82. Pujol J-L, Lavole A, Quoix E, Molinier O, Souquet P-J, Barlesi F, et al. Randomized phase II-III study of bevacizumab in combination with chemotherapy in previously untreated extensive small-cell lung cancer: results from the IFCT-0802 trial†. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015 May;26(5):908–14.
83. Salaun P-Y, Bodet-Milin C, Frampas E, Oudoux A, Sai-Maurel C, Faivre-Chauvet A, et al. Toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and bevacizumab in a mouse model of medullary thyroid carcinoma. *Cancer.* 2010 Feb 15;116(4 Suppl):1053–8.
84. Kasuya K, Nagakawa Y, Suzuki M, Tanaka H, Ohta H, Itoi T, et al. Anti-vascular endothelial growth factor antibody single therapy for pancreatic neuroendocrine carcinoma exhibits a marked tumor growth-inhibitory effect. *Exp Ther Med.* 2011 Nov;2(6):1047–52.
85. Kasuya K, Nagakawa Y, Suzuki M, Suzuki Y, Kyo B, Suzuki S, et al. Combination therapy of gemcitabine or oral S-1 with the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab for pancreatic neuroendocrine carcinoma. *Exp Ther Med.* 2012 Apr;3(4):599–602.
86. Takeuchi S, Honma R, Taguchi J, Amano T, Shimizu Y, Kinoshita I, et al. A Case of High-Grade Neuroendocrine Carcinoma That Improved with Bevacizumab plus Modified FOLFOX6 as the Fourth-Line Chemotherapy. *Case Rep Oncol.* 2011 May;4(2):260–6.
87. Yokouchi H, Kitahashi M, Oshitari T, Yamamoto S. Intravitreal bevacizumab for iris tumor metastasized from large cell neuroendocrine carcinoma of lung. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 2013 Sep;251(9):2243–5.
88. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 1994 Feb 25;76(4):597–8.
89. Seelenmeyer C, Wegehingel S, Tews I, Künzler M, Aebi M, Nickel W. Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J Cell Biol.* 2005 Oct 24;171(2):373–81.
90. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006 Nov;16(11):137R-157R.
91. Ito K, Stannard K, Gabutero E, Clark AM, Neo S-Y, Onturk S, et al. Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Dec;31(3–4):763–78.
92. Liu F-T, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005 Jan;5(1):29–41.
93. Cousin JM, Cloninger MJ. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 16;17(9).

94. Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.* 2008 Feb;172(2):545–53.
95. Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, et al. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol.* 2008 Jul;215(3):330–9.
96. Vergara D, Merlot B, Lucot J-P, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2010 May 1;291(1):59–66.
97. Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 2008 Feb 1;68(3):937–45.
98. Galván JA, Astudillo A, Vallina A, Crespo G, Folgueras MV, González MV. Prognostic and diagnostic value of epithelial to mesenchymal transition markers in pulmonary neuroendocrine tumors. *BMC Cancer.* 2014 Nov 20;14:855.
99. Galván JA, Astudillo A, Vallina A, Fonseca PJ, Gómez-Izquierdo L, García-Carbonero R, et al. Epithelial-mesenchymal transition markers in the differential diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol.* 2013 Jul;140(1):61–72.
100. Bacigalupo ML, Manzi M, Espelt MV, Gentilini LD, Compagno D, Laderach DJ, et al. Galectin-1 triggers epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 2015 Jun;230(6):1298–309.
101. Zhi K, Shen X, Zhang H, Bi J. Cancer-associated fibroblasts are positively correlated with metastatic potential of human gastric cancers. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2010 Jun 8;29:66.
102. Herrera A, Herrera M, Guerra-Perez N, Galindo-Pumariño C, Larriba MJ, García-Barberán V, et al. Endothelial cell activation on 3D-matrices derived from PDGF-BB-stimulated fibroblasts is mediated by Snail1. *Oncogenesis.* 2018 Sep 24;7(9):76.
103. Orozco CA, Martinez-Bosch N, Guerrero PE, Vinaixa J, Dalotto-Moreno T, Iglesias M, et al. Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor–stroma crosstalk. *Proc Natl Acad Sci.* 2018 Apr 17;115(16):E3769–78.
104. Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, et al. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res.* 2003 Dec 15;63(24):8614–22.
105. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell.* 2004 Mar;5(3):241–51.
106. Wu M-H, Hong T-M, Cheng H-W, Pan S-H, Liang Y-R, Hong H-C, et al. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res MCR.* 2009 Mar;7(3):311–8.

107. Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Méndez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell*. 2014 Feb 13;156(4):744–58.
108. Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, et al. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*. 2012 Oct 22;209(11):1985–2000.
109. Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Méndez-Huergo SP, et al. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res*. 2013 Feb 1;73(3):1107–17.
110. Laderach DJ, Gentilini LD, Giribaldi L, Delgado VC, Nugnes L, Croci DO, et al. A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer Res*. 2013 Jan 1;73(1):86–96.
111. Oliva JL, Caino MC, Senderowicz AM, Kazanietz MG. S-Phase-specific activation of PKC alpha induces senescence in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5466–76.
112. Atienza JM, Roth RB, Rosette C, Smylie KJ, Kammerer S, Rehbock J, et al. Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2005 Mar;4(3):361–8.

ANEXO

Publicaciones relacionadas con este trabajo de tesis:

- **Maria Rodriguez-Remirez**, Laura del Puerto-Nevado , Maria Jesus Fernandez-Aceñero, Hakimeh Ebrahimi-Nik, Marlid Cruz-Ramos, Laura Garcia-Garcia, Sonia Solanes, Natalia Baños, Elena Molina-Roldan, Jesús Garcia-Foncillas*, Arancha Cebrian. Strong antitumor activity of bevacizumab and aflibercept in Neuroendocrine Carcinomas: In-depth preclinical study. 2018 (2ª Revision en Neuroendocrinology)

Otras publicaciones obtenidas durante el desarrollo de este trabajo de tesis:

- Aurea Borrero-Palacios, Arancha Cebrian, Teresa Gomez del Pulgar, Rocío García-Carbonero, Pilar Garcia, Enrique Aranda, Elena Elez, Rafael López-López, Andres Cervantes, Manuel Valladares, Cristina Nadal, Jose M. Vieitez, Carmen Guillen-Ponce, Javier Rodriguez, Irene Hernandez, Jose Luis Garcia, Ricardo Vega-Bravo, Alberto Puime-Otin, Javier Martinez-Useros, Laura del Puerto-Nevado, Raul Rincon, **Maria Rodriguez-Remirez**, Federico Rojo, and Jesus Garcia-Foncillas. Combination of KIR2DS4 and FcγRIIIa polymorphisms predicts the response to cetuximab in KRAS mutant metastatic colorectal cancer, 2018
- Cruz-Ramos M, Del Puerto-Nevado L, Zheng B, López-Bajo R, Cebrian A, **Rodríguez-Remirez M**, García-García L, Solanes-Casado S, García-Foncillas J. Prognostic significance of neutrophil-to lymphocyte ratio and platelet-to lymphocyte ratio in older patients with metastatic colorrectal cancer. *J Geriatr Oncol.* S1879-4068(18)30256-X, 2018
- Martinez-Useros J, Moreno I, Fernandez-Aceñero MJ, **Rodríguez-Remirez M**, Borrero-Palacios A, Cebrian A, Gomez Del Pulgar T, Del Puerto-Nevado L, Li W, Puime-Otin A, Perez N, Soengas MS, Garcia-Foncillas J. The potential predictive value of DEK expression for neoadjuvant chemoradiotherapy response in locally advanced rectal cancer. *BMC Cancer.* 18(1):144, 2018
- Martinez-Useros J, Georgiev-Hristov T, Fernández-Aceñero MJ, Borrero-Palacios A, Indacochea A, Guerrero S, Li W, Cebrián A, Gómez Del Pulgar T, Puime-Otin A, Del Puerto-Nevado L, **Rodríguez-Remírez M**, Pérez N, Celdrán A, Gebauer F, Garcia-Foncillas J. UNR/CDSE1 expression as prognosis biomarker in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma patients: A proof-of-concept. *PLoS One.* 12:e0182044, 2017
- Cebrián A, Gómez Del Pulgar T, Méndez-Vidal MJ, González ML, Lainez N, Castellano D, García-Carbonero I, Esteban E, Sáez MI, Villatoro R, Suárez C, Carrato A, Munárriz-Ferrándiz J, Basterrechea L, García-Alonso M, González-Larriba JL, Perez-Valderrama B, Cruz-Jurado J, González Del Alba A, Moreno F, Reynés G, **Rodríguez-Remírez M**, Boni V, Mahillo-Fernández I, Martin Y, Viqueira A, García-Foncillas J. Functional PTGS2 polymorphism-based models as novel predictive markers in metastatic renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib. *Sci Rep.* 7:41371, 2017

- Cebrián A, Gómez del Pulgar T, Fernández-Aceñero MJ, Borrero-Palacios A, del Puerto-Nevado L, Martínez-Useros J, Marín-Arango JP, Caramés C, Vega-Bravo R, **Rodríguez-Remírez M**, Manzarbeitia F, García-Foncillas J. Decreased PLK1 expression denotes therapy resistance and unfavourable disease-free survival in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *Pathology Oncology Research* 212:1133-1137, 2016
- del Puerto-Nevado P, Marín-Arango JP, Fernández-Aceñero MJ, Arroyo-Manzano D, Martínez-Useros J, Borrero-Palacios A, **Rodríguez-Remírez M**, Cebrian A, Gomez del Pulgar T, Cruz-Ramos M, Carames C, Lopez-Botet B, García-Foncillas J. Predictive value of VRK1 and 2 for rectal adenocarcinoma response to neoadjuvant chemoradiation therapy: a retrospective observational cohort study. *BMC cancer* 16:519, 2016
- Aguilera O, Muñoz-Sagastibelza M, Torrejón B, Borrero-Palacios A, Del Puerto-Nevado L, Martínez-Useros J, **Rodríguez-Remírez M**, Zazo S, García E, Fraga M, Rojo F, García-Foncillas J. Vitamin C uncouples the Warburg metabolic switch in KRAS mutant colon cancer. *Oncotarget*. 7(30):47954-47965, 2016
- Gómez del Pulgar , Cebrián A, Fernández-Aceñero MJ, Borrero-Palacios A, del Puerto-Nevado L, Martínez-Useros J, Marín-Arango JP, Caramés C, Vega-Bravo R, **Rodríguez-Remírez M**, Cruz-Ramos M, Manzarbeitia F, García-Foncillas J. Focal Adhesion Kinase: predictor of tumor response and risk factor for recurrence after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *J Cell Mol Med* 20:1729-1736, 2016
- Martínez-Useros J, Georgiev-Hristov T, Borrero-Palacios A, Fernández-Aceñero MJ, **Rodríguez-Remírez M**, del Puerto-Nevado L, Cebrian A, Gomez del Pulgar MT, Cazorla A, Vega-Bravo R, Perez N, Celdran A, Garcia-Foncillas J. Identification of Poor-outcome Biliopancreatic Carcinoma Patients With Two-marker Signature Based on ATF6 α and p-p38 "STARD Compliant". *Medicine (Baltimore)*. 94:e1972, 2015
- Caramés C, Cristóbal I, Moreno V, del Puerto L, Moreno I, **Rodríguez M**, Marín JP, Correa AV, Hernández R, Zenzola V, Hernández T, León A, Martín JI, Sánchez-Fayos P, García-Olmo D, Rojo F, Goel A, Fernandez-Aceñero MJ, García-Foncillas J. MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2015 Jul;30(7):899-906. doi: 10.1007/s00384-015-2231-9. Epub 2015 May 8. PubMed PMID: 25953218.

De: Arancha Cebrian Aranda
Enviado el: martes, 05 de marzo de 2019 16:59
Para: Maria Rodriguez Remirez
Asunto: RV: 201812008

De: editorialoffice@karger.com [editorialoffice@karger.com]
Enviado: lunes, 4 de marzo de 2019 18:30
Para: Arancha Cebrian Aranda
Asunto: NEN: 201812008

Ms. No. 201812008

Dear Dr. Cebrián,

Thank you for submitting a revised version of your manuscript entitled "Strong antitumor activity of bevacizumab and aflibercept in Neuroendocrine Carcinomas: In-depth preclinical study" to Neuroendocrinology. It will now be forwarded to the Editor and we shall inform you of the decision as soon as possible.

For information regarding the status of your manuscript and for future submissions to Neuroendocrinology, you can log in to the manuscript tracking system with your login information as follows:

https://xpresstrackcloud.net/karger/xpresstrack/submissions/author_login.cfm?jid=113
Logon Name: ^^recip_login_name^^

Password: If you have forgotten your password it can be reset using the following link:
https://xpresstrackcloud.net/karger/xpresstrack/submissions/author_login.cfm?jid=113

With kind regards,

Allison Kirsop, PhD
Editorial Manager

Neuroendocrinology
Editor-in-Chief: Robert Millar
Neuroendocrinology Editorial Office
79 Louis Braille Way
Gorebridge
Midlothian
EH23 4UL

Fax: +44 131 672 3248
Email: editor@nen-edinburgh.org

**Strong antitumor activity of bevacizumab and aflibercept in Neuroendocrine
Carcinomas: In-depth preclinical study**

Maria Rodriguez-Remirez¹, Laura del Puerto-Nevaldo ¹, Maria Jesus Fernandez-Aceñero²,
Hakimeh Ebrahimi-Nik³, Marlid Cruz-Ramos¹, Laura Garcia-Garcia¹, Sonia Solanes¹,
Natalia Baños¹, Elena Molina-Roldan², Jesús Garcia-Foncillas^{1*}, Arancha Cebrian^{1*}

¹Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS - Fundación Jiménez Díaz
University Hospital (IIS-FJD, UAM), Avenida Reyes Católicos 2, 28040, Madrid, Spain.

²Servicio de Anatomía Patológica Hospital Clínico San Carlos; Departamento de
Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid
(UCM); Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC),
Madrid, España.

³Department of Immunology, The Carole and Ray Neag Comprehensive Cancer Center,
University of Connecticut School of Medicine, Farmington, CT, United States

* Both authors equally contributed to the paper

Short title: Preclinical approach for new therapy in NECs

Corresponding author

Arancha Cebrian Aranda, PhD. Translational Oncology Division, Oncohealth Institute,
Health Research Institute FJD-UAM. University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz".
Avenida Reyes Católicos, 2- 28040 Madrid (Spain). E-mail:
arancha.cebrian@oncohealth.eu

Jesús García-Foncillas, Professor, MD, PhD, Translational Oncology Division, Oncohealth
Institute, Health Research Institute FJD-UAM. University Hospital "Fundacion Jimenez
Diaz". Avenida Reyes Católicos, 2- 28040 Madrid (Spain). E-mail:
jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu

Keywords: Neuroendocrine carcinomas, tumor growth, therapy.

1 **Abstract**

2 **Background**

3 Neuroendocrine carcinoma (NEC) is a rare and very aggressive tumor. It has been greatly
4 understudied and very little is known about optimal treatment strategy for patients with
5 this disease. The purpose of this study was to evaluate *in vivo* whether anti-VEGF drugs
6 could be a therapeutic alternative for these tumors with a poor prognosis.

7 **Methods**

8 We have developed two xenograft models using either human cell line derived from
9 lung (H460) or from colon (COLO320) NEC to assess the effect of two antiangiogenic
10 drugs, aflibercept and bevacizumab, on tumor growth and their pathological
11 characteristics. Additionally, tumors were subjected to immunohistochemistry staining
12 and proteins were measurement with western blot and ELISA.

13 **Results**

14 Both aflibercept and bevacizumab showed significant antitumor activity ($p < 0.001$). In
15 the H460 model, aflibercept resulted in 94% tumor growth inhibition (TGI) and
16 bevacizumab treatment resulted in 72.2% TGI. Similarly, in the COLO320 model,
17 aflibercept and bevacizumab resulted in 89.3% and 84% TGI, respectively. Moreover,
18 antitumor activity occurs early after treatment initiation. Using Tumor Control Index
19 score, which address the kinetics of tumor growth in a way comparable to the methods
20 used in human clinical studies, we confirmed that both drugs inhibit significantly tumor
21 growth. When tumor stabilization was evaluated, aflibercept shows higher ability to
22 stabilize NEC tumors than bevacizumab.

23 **Conclusion**

24 Results derived from this study strongly support anti-VEGF therapies, especially
25 aflibercept, as a novel therapeutic option in NECs. Further studies are necessary, but our
26 observations encourage the evaluation of antiangiogenics in clinical trials combined with
27 standard chemotherapy.

28

29 **Introduction**

30 Neuroendocrine neoplasms (NENs) are a heterogeneous group of tumors arising from the
31 diffuse neuroendocrine system. Although still rare, their incidence have increased for the
32 last years (1). Due to their low frequency, their clinical management remains challenging.
33 These neoplasms present a wide range of morphological, functional and behavioral
34 characteristics.

35 These lesions mainly affect the lung or the gastrointestinal (GI) system. In 2010, the
36 World Health Organization (WHO) classified gastrointestinal neuroendocrine neoplasias
37 into Well-differentiated tumors (NET G1 and NET G2) and poorly differentiated
38 neuroendocrine carcinoma (NEC G3) (2). Similarly, lung NETs were divided into well
39 differentiated tumors -low-grade (typical carcinoids) and intermediate-grade (atypical
40 carcinoids)- and poorly differentiated or high-grade tumors which include small-cell lung
41 cancer and large-cell neuroendocrine carcinoma (3).

42 The identification of the neuroendocrine phenotype is based on the evaluation of specific
43 immunohistochemical markers. Among these, chromogranin A (CgA) and synaptophysin
44 are the most reliable stains (4). G3 NEC is also defined as having a Ki-67 proliferative index
45 over 20% or a mitotic rate higher than 20 per 10 high-power fields (5).

46 Well-differentiated NETs are usually indolent and clinical signs only present in patients
47 with advanced disease with symptoms derived from tumor bulk or due to a hormonal
48 syndrome (6). On the other hand, neuroendocrine carcinomas (NECs) show a poor
49 prognosis and highly aggressive behavior that results in a very short overall survival,
50 between 12 and 6 months in patients with regional and distant disease, respectively (1).
51 Surgery is recommended in cases of resectable disease, but unresectable disease has few
52 medical therapeutic options. In Well-differentiated NETs everolimus, an mTOR inhibitor is
53 able to significantly prolong the progression-free survival in patients with gastrointestinal,
54 pancreatic, and lung NETs (7,8). It has been also demonstrated that tyrosine kinase
55 inhibitors, such as sunitinib, have significant antitumor efficacy compared to placebo.
56 Neuroendocrine carcinomas have less therapeutic options, usually chemotherapy with
57 cisplatin and etoposide as used as the standard treatment. The ominous prognosis of
58 these patients makes the search for alternative therapeutic options mandatory.

59 Angiogenesis, defined as formation of new blood vessels, plays an important role in
60 pathological processes and is tightly regulated by a balance of pro-angiogenic and anti-
61 angiogenic signaling in normal physiology (9). Neovascularization is required to supply
62 growing tumors with oxygen and nutrients. VEGF family is the principal regulator of
63 tumor angiogenesis and is constituted of five glycoproteins, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C,
64 VEGF-D and placental growth factor PGF, also known as PlGF. These ligands interact with
65 the receptor tyrosine kinases VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3 and these interactions are
66 also regulated by the non-enzymatic co-receptors neuropilin (Nrp)-1 (10). Despite
67 neuroendocrine carcinomas are less vascular tumors their vessels possess high
68 proliferative activity displaying the highest angiogenic activity in the endothelial cells (9).
69 As consequence the angiogenesis is more pronounced in NEC than in NETs (11).
70 Antiangiogenic agents have been tested in pre-clinical and clinical studies to investigate
71 their benefits in well-differentiated neuroendocrine tumors. One of the most used
72 antiangiogenic agents is bevacizumab (Avastin, Genentech, South San Francisco, CA), a
73 recombinant humanized monoclonal antibody against the VEGF ligand, VEGF-A. Some
74 early clinical trials showed encouraging results with bevacizumab in carcinoid tumors (12–
75 15), although randomized phase II-III studies failed to show an antitumor effect relevant
76 enough to change the standard of care in this setting (16,17).

77 Aflibercept (VEGF-Trap, Sanofi-aventis, Paris, France) is a recombinant fusion
78 protein consisting of VEGF-binding portions from the extracellular domains of human
79 VEGFR1 and 2 and fused to the Fc portion of human IgG1 antibody. This protein
80 neutralizes VEGF-A, -B and PlGF with high affinity, in contrast to bevacizumab, which only
81 binds to human VEGF-A (18). Pre-clinical trials demonstrated the efficacy of aflibercept in
82 suppressing tumor growth and angiogenesis through its ability to bind VEGFs in
83 hepatocellular carcinoma (19), breast cancer (20) , neuroblastoma (21), ovarian cancer
84 (22) and pancreatic cancer (23) among others. Due to the characteristics of this
85 recombinant fusion protein, it results in an attractive therapeutic alternative to be tested
86 in neuroendocrine carcinoma.

87 The aim of this study was to explore the antitumor effects of two different VEGF pathway-
88 targeted therapies as an alternative treatment for neuroendocrine carcinomas. To this

89 end, we have developed preclinical models using different cell lines derived from lung
90 (H460) and colon (COLO320) NEC to investigate the effects of these drugs on tumor
91 growth of NEC-bearing mice as well as their pathological characteristics.

92 **Materials and Methods**

93 Cell culture and reagents

94 H460 cell line is a human large-cell lung neuroendocrine carcinoma (LCNEC) and COLO320
95 cell line is a human colon adenocarcinoma with neuroendocrine carcinoma
96 characteristics. Both cell lines were purchased from the American Type Cell Collection
97 (ATCC, Milan, Italy). Cell lines were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10%
98 fetal bovine serum (FBS) and 5% penicillin and streptomycin. Cells were maintained at
99 37°C in a 5% CO₂-incubator. The two agents used in the study, bevacizumab and
100 aflibercept, were provided by the Pharmacy Department of Fundación Jimenez Diaz
101 Hospital and Sanofi-aventis, S.A, respectively.

102 Animals

103 8-week-old female Athymic Nude-Foxn1nu mice were obtained from Harlan Laboratories
104 (Envigo Crs, S.A., Barcelona). The animals had free access to chlorinated water and
105 irradiant food with conditions of constant photoperiod 12 h light/12 h dark at 25–28 °C
106 and 45–65% humidity.

107 Mouse Xenograft model

108 A total of 36 mice were used to develop the xenograft models, 18 out of 36 received
109 subcutaneous injections of 2×10^6 H460 cells in a volume of 200 μ l [1:1 mixture of PBS:
110 Matrigel (BD Biosciences)] into the two flanks. The remaining 18 mice received
111 subcutaneous injections of 2×10^6 COLO320 cells in similar conditions. Once the tumors
112 became measurable (150 mm^3), animals were randomized into control (n=6) or treatment
113 groups (aflibercept, n=6 or bevacizumab, n=6). The doses for bevacizumab and aflibercept
114 were determined on the basis of previous reports (24,25), 5mg/kg (i.p.) and 25 mg/kg
115 (s.c.), respectively, every three days during a period of 21 days. Tumor volume and weight
116 were measured three times a week. A total of thirty xenograft tumors derived from H460

117 cell line (12 controls, 9 treated with aflibercept and 9 treated with bevacizumab) and
118 twenty-seven from COLO320 cell line (12 controls, 8 treated with aflibercept and 7
119 treated with bevacizumab) were used to assess the antitumor activity analyses.

120 Tumor measurement

121 To evaluate the antitumor activity of bevacizumab and aflibercept, tumor volumes were
122 calculated according to the equation $(a \times b^2) / 2$, where “a” represents the largest tumor
123 diameter and “b” represents the perpendicular tumor diameter. Tumor growth curves
124 were plotted representing the mean value of tumor volume for aflibercept, bevacizumab
125 or control group during the 3 week treatment period.

126 The study of antitumor activity was also evaluated in the first and last week of treatment.
127 In these cases, tumor volume ratios were calculated by dividing mean tumor volume on
128 day 7 by mean tumor volume on day 1 (early phase) or mean tumor volume on day 21 by
129 mean tumor volume on day 14 (late phase). Additionally, we analyzed the induction of
130 complete tumor arrest; changes in tumor volume for each treated group were calculated
131 for each animal, tumor volume on 21 day minus volume on the first day of treatment
132 (ΔT). In case of control group median ΔC was calculated. The ratio $\Delta T/\text{median } \Delta C$ was
133 calculated and expressed as a percentage. Ratio values $\leq 0\%$ indicated complete arrest.

134 Tumor Control Index (TCI)

135 The TCI score for each individual mouse, as well as the average TCI score for each group,
136 was calculated using “SL TCI Macro” (26) where the stability was measured within the
137 window of day 1-day 21. A maximum fluctuation of 15% in regards to tumor size was
138 allowed when calculating the stability score. Mice with less than five stable days received
139 a stability score of 0.

140 Characterization of tumors derived from neuroendocrine carcinoma cell lines

141 Tumors were fixed in formalin and embedded in paraffin. Hematoxylin–eosin and
142 immunohistochemical (IHC) staining procedures were performed according to routine
143 protocols. Antigen retrieval was performed in PT-Link (Dako, Glostrup, Denmark) for 20
144 min at 95°C in low pH buffered solution (Dako). Endogenous peroxidase was blocked by

145 immersing the sections in 0.03% hydrogen peroxide for 5 min. Slides were washed for 5
146 min with Tris-buffered saline solution containing Tween 20 at pH 7.6 and incubated with
147 the primary antibodies, Ki67 (GA626, Dako), chromogranin A (CgA) (M0869, Dako)
148 synaptophysin (IR660, Dako), p53 (GA616, Dako) and CK20 (GA777, Dako) for 20 min at
149 room temperature, followed by incubation with the appropriate anti-Ig horseradish
150 peroxidase-conjugated polymer (EnVision, Dako) to detect antigen-antibody. Sections
151 were then visualized with diaminobenzidine as a chromogen for 5 min and counterstained
152 with hematoxylin.

153 Western-Blot

154 Proteins were extracted with standard homogenization buffer (RIPA) supplemented with
155 complete protease inhibitor cocktail (Roche) and PhosSTOP phosphatase inhibitor tablet
156 (Roche) iced for 20 min to complete cell lysis and then centrifuged at 12000 rpm at 4°C
157 for 10 min. Total protein concentration was quantified with pierce BCA protein assay kit
158 (Thermo Scientific™). Equal amounts of proteins were resolved by 10% sodium dodecyl
159 sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose
160 membrane. The membranes were washed with Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST)
161 solution, and blocked with 5% skimmed milk for 1h. An appropriated primary antibody,
162 VEGF-B (sc-80442) or PlGF (ab32570), was incubated at 4°C overnight. The membrane
163 was then washed and detected with a rabbit or mouse HRP-conjugated secondary
164 antibody. The bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham
165 Pharmacia Biotech Inc.) using Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

166 ELISA

167 Measurement VEGF-A ligand was performed using commercially ELISA Kit (VEGFA),
168 (Cloud-Clone Copr, Katy TX, USA) according to the manufacturer's instructions.

169 Statistical analysis

170 All statistical analysis was performed using SPSS software version 20.0 (SPSS Inc., Chicago,
171 IL). Tumor volumes were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The differences in

172 the final tumor volumes between treatment and control groups as well as in the first or
173 the last week, separately, were evaluated by ANOVA test.

174 Comparisons between the changes in tumor volume for each treatment were evaluated
175 by Mann-Whitney test.

176 The statistical analysis for TCI scores was performed using a two-tailed t-test. $P < 0.05$ was
177 considered statistically significant (SL TCI Macro).

178 **Results**

179 ***Positive immunohistochemical markers for neuroendocrine carcinomas.*** NEC are defined
180 as poorly differentiated tumors expressing neuroendocrine markers as chromogranin A
181 (CgA) and synaptophysin, and with a high proliferative index (Ki-67 > 20%). Figure 1A
182 shows that xenograft tumors derived from H460 or COLO320 cell lines were positive for
183 CgA and synaptophysin and showed high Ki-67 proliferation rates, with mean values of
184 86% and 78% for H460 and COLO320 xenograft model, respectively. This high
185 proliferative index suggests that these xenograft tumors are neuroendocrine carcinomas.
186 Moreover, we evaluated tumor necrosis since it has been described that a geographic
187 pattern of necrosis is more commonly seen in NECs (27,28). Xenograft tumors derived
188 from both cell lines showed strong necrosis (Figure 1A). As p53 expression has been
189 described as one of the surrogate biomarkers of NEC (28,29) it was also analyzed in these
190 xenograft tumors by immunohistochemistry. Abnormal immunolabelling for p53, defined
191 as robust nuclear accumulation of immunolabeled protein in the $\geq 30\%$ of the neoplastic
192 cells, was observed in both xenograft models (Figure 1A).

193 COLO320 cell line has been described as Mixed Adenoneuroendocrine Carcinoma,
194 Cytokeratin 20 (CK-20) positivity was assessed in COLO320 xenograft tumors. However,
195 none of neoplastic cells expressed CK20 (data not shown) supporting these tumors show
196 characteristics of pure NEC.

197 Together, these results point to xenograft tumors derived from H460 or COLO320 cell
198 lines are of neuroendocrine carcinoma origin.

199 ***Induction of tumor growth inhibition.*** The antitumor activity of both treatments
200 (aflibercept and bevacizumab) was examined for H460 xenograft model, 9 tumors treated

201 with aflibercept and 9 treated with bevacizumab were compared with 12 control tumors.
202 In the case of COLO320 xenograft model, 8 tumors treated with aflibercept and 7 tumors
203 treated with bevacizumab were compared with 12 control tumors. We observed that all
204 treated tumors were smaller and less irrigated than control groups. It was especially
205 striking in the case of tumors treated with aflibercept (Fig. 1B). In H460 model, aflibercept
206 treatment resulted in a final mean tumor volume of $210.75 \pm 166\text{mm}^3$ –a 94% tumor
207 growth inhibition versus control ($3807.93 \pm 1371\text{mm}^3$; $p < 0.001$) on day 21. Bevacizumab
208 treatment resulted in a final mean tumor volume of $1039.58 \pm 414\text{mm}^3$, representing a
209 72.7% tumor growth inhibition versus control ($p < 0.001$) (Fig. 2A). Similarly, we evaluated
210 tumor growth inhibition in COLO320 xenograft model; aflibercept treatment resulted in
211 final mean tumor volume of $397.67 \pm 237\text{mm}^3$ (89.3% tumor growth inhibition) whereas
212 bevacizumab showed a final mean tumor volume of $590.38 \pm 268\text{mm}^3$ (84.1% tumor
213 growth inhibition) versus control group ($3706.27 \pm 1918\text{mm}^3$; $p < 0.001$) (Fig. 2B).

214 To evaluate more deeply the antitumor activity of both drugs, tumor volume ratio was
215 examined in early (days 1-7) and late (days 14-21) phases. In both animal models the two
216 drugs showed significant efficacy compared to their controls ($p < 0.001$) since the
217 beginning of treatment (early phase) (Fig. 3B). Taken together all these results confirm
218 that both drugs show high antitumor activities in colon NECs and LCNECs.

219 ***Induction of complete tumor arrest.*** When ΔT /median ΔC values were compared in H460
220 model, we observed that tumors treated with aflibercept (n=9) varied between 4.67% and
221 -1.24% whereas in the bevacizumab group (n=9) ranged between 30.54% and 12.23%.
222 The differences between both treatments were statistically significant ($p < 0.001$). It is
223 important to highlight that aflibercept induced complete tumor arrest (ΔT /median $\Delta C \leq 0$)
224 in 6 out of 9 tumors (66%) (Fig. 4A). In COLO320 tumors, the values varied from 10.02% to
225 3.26% in aflibercept group (n=8) and, from 16.32% to 2.65% in bevacizumab group (n=7).
226 These differences did not reach statistical significance pointing out that both treatments
227 have similar effects in COLO320 tumors (Fig. 4B). All these results together indicate that
228 aflibercept has not only a high antitumor activity, but it is also able to induce tumor arrest
229 at least in lung NECs.

230 ***Anti-VEGF drugs inhibit tumor growth and stabilize NEC xenograft.*** Since standard
231 methods of measuring tumor response (comparison of average tumor diameters at one
232 or more discrete time points, survival curve as well as area under the curve, AUC) fail to
233 reveal the complexity of tumor growth, we used the recently published “SL TCI” tool as an
234 alternative method to measure the kinetics of tumor growth in our xenograft models. TCI
235 scores encompass all aspects of a tumor’s behavior. It is a composite of three individual
236 scores namely, “tumor Inhibition”, which represents the change in tumor growth of the
237 treated group versus the control, “tumor stabilization”, which indicates the duration of
238 reasonably unchanged tumor growth, and “tumor rejection”. This method has been
239 validated with various tumor growth data. Moreover, it has been shown that TCI can rank
240 the tumor growth data more accurately than AUC (26).

241 The TCI score was significantly higher in treated groups in comparison to the control
242 group in both tumor models. The TCI score of mice treated with aflibercept (TCI score =
243 12.03) was statistically higher than mice treated with bevacizumab (TCI score = 8.38) in
244 the H460 model ($p < 0.001$) (Fig. 5A). However, when TCI scores of aflibercept and
245 bevacizumab were compared in the COLO320 model, we observed no significant
246 differences, with values of 11.64 and 10.5, respectively (Fig. 5B). This indicates that
247 aflibercept mediated better tumor inhibition effects in comparison to bevacizumab in the
248 H460 tumor model whereas both drugs have similar tumor inhibition effects in the
249 COLO320 model.

250 Since tumor stasis was one of the key observations in treated groups, we analyzed tumor
251 stabilization as a separate individual score. Stability scores were measured based on the
252 number of days in which the tumor size did not vary by more than 15% (Fig. 6). The H460
253 tumor model gave a higher stability score when treated with aflibercept (stability score =
254 2.1) than the control group (stability score = 0.31, $p < 0.05$) while the difference between
255 the stability score of bevacizumab (stability score = 0.9) and control group (stability score
256 = 0.31) was not statistically significant (Fig. 6A). Also, aflibercept (stability score = 2.4,
257 $p < 0.001$) stabilized the COLO320 tumor significantly more than the bevacizumab (stability
258 score = 1.4, $p < 0.05$; Fig. 6B). These results show the ability of bevacizumab and more
259 importantly aflibercept to stabilize the COLO320 and H460 tumor models.

260 **Expression of VEGFA, VEGFB and PIGF in Tumor lysates.** Aflibercept showed stronger
261 antitumor activity in lung NECs than in gastrointestinal NECs. We evaluated the protein
262 levels of VEGFA, VEGFB and PIGF as targets of bevacizumab and aflibercept to confirm if
263 both treatments reduce their levels with the same efficacy (Fig. 7). Aflibercept and
264 bevacizumab decreased significantly VEGFA expression in colon NECs and LCNECs
265 ($p < 0.05$, Fig. 7A). VEGFB and PIGF levels also decreased with aflibercept treatment in
266 both xenograft model (H460 $p < 0.001$; COLO320 $p < 0.05$), this did not happen with
267 bevacizumab treatment since they are not recognized by this drug (Fig. 7B). We did not
268 observed significant differences between the reduced levels of VEGFA, VEGFB and PIGF
269 by aflibercept in lung and gastrointestinal NECs.

270 **Discussion**

271 More than one-half of patients with neuroendocrine carcinoma debut with metastatic
272 and unresectable disease at diagnosis. These patients, without treatment, show
273 aggressive and rapid disease progression (30) which entails poor outcomes in terms of
274 overall survival (4 to 6 months) (5). This scenario makes necessary to evaluate the
275 current therapeutical options as well as to investigate new targets to get better survival
276 rates in these patients.

277 SCLC and NECs share common histological and clinical features and this has led to the
278 acceptance of treating NECs with similar therapies as SLCL being platinum-based
279 regimens the most widely used as first line treatment (31–33). Although the
280 combination of cisplatin and etoposide reaches a high response rate, disease free
281 intervals and overall survival still remain short (34,35). Furthermore, pulmonary high-
282 grade large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) exhibits complex
283 clinicopathological and biological features which make it difficult to constitute an
284 optimal chemotherapy regimen (36). Several studies point to LCNEC patients should
285 be treated as SCLC (37,38) while others claim that they should be treated as NSCLC
286 (39).

287 In spite of described above, the current situation related to the management of these
288 patients has barely changed in the last two decades. The lack of prospective information
289 regarding the management of NECs and the low frequency of these tumors make it

290 difficult to conduct clinical trials to evaluate new therapies that could enhance the
291 overall survival of these patients. However, it is worth mentioning that there is an
292 ongoing randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin and standard
293 etoposide/cisplatin regimens in patients with extensive-disease small and large cell lung
294 cancer that could shed light on the best regimen for this tumor (40).

295 Taking into account the lack of information related to these tumors and their
296 therapeutical options, xenograft models of human cancer emerge as an important
297 approach for screening of new anticancer agents.

298 NENs are hypervascular tumors and are known to express angiogenic molecules. In fact,
299 from the very first studies of vascular endothelial growth factor pathway, VEGF has been
300 considered as an important prognostic marker in neuroendocrine neoplasms (41).
301 Therefore, anti-angiogenic therapy is expected to be effective against NECs and
302 xenograft models the best tool for testing this proof of concept.

303 It is important to emphasize that COLO320 has been previously described as Mixed
304 Adenoneuroendocrine Carcinoma. However, a few studies reported this cell line as NEC.
305 Quinn *et al.* already stated that COLO320 was of neuroendocrine origin rather than of
306 colonic adenoepithelial origin (42). Later, Sunday *et al.* published a study based on
307 COLO320 as human neuroendocrine carcinoma line (43). Regarding H460, it is a large
308 cell lung carcinoma cell line reported as neuroendocrine carcinoma in different studies
309 (44,45). As far as we know, none of the studies on xenograft tumors derived from these
310 cell lines assessed proliferative rate (Ki-67 index or mitotic rate), necrosis pattern or
311 surrogate markers as p53 expression to confirm their neuroendocrine origin. What we
312 did first was to evaluate the xenograft tumors derived from H460 or COLO320 cell line
313 by immunohistochemistry for NE markers, proliferation indices and molecular
314 alterations (Table 1). The results were consistent with a NEC origin. Therefore, we think
315 it is important for future *in vivo* studies using these cell lines consider these evidences.

316 In this context and with it in mind, we designed a pre-clinical study to evaluate if
317 interfering VEGF signaling, by two different antiangiogenic therapies, may result in anti-
318 tumor activity in neuroendocrine carcinomas. The results derived from this study are
319 summarized in Table 1. Both therapies have high antitumor activity in NEC xenograft
320 models with more than 70% of antitumor effect, being specially striking in the lung NEC

321 model treated with aflibercept with a 94% of antitumor activity, finding a novel
322 therapeutical approach never reported before in these tumors.

323 To address the kinetics of tumor growth in a way comparable to the methods used in
324 human clinical studies we used the recently published TCI tool (26) since comprises of
325 measurements of tumor inhibition, tumor rejection, as well as tumor stabilization. Thus,
326 this composite score provides an in-depth insight of drug behavior.

327 Our results showed that TCI score of aflibercept and bevacizumab were statistically
328 significant in both models. Moreover, aflibercept exerted a better tumor inhibition
329 effects in the lung NECs than bevacizumab. If we focus on the stability score both
330 treatments have the ability to stabilize gastrointestinal xenograft model and lung NEC
331 xenograft model.

332 The initial anticancer activity of anti-VEGF drugs lies in its ability to normalize tumor
333 blood vessels allowing chemotherapy to reach the tumor. Bevacizumab is commonly
334 used in combination with platinum-based drugs in the therapy of several tumors, such
335 as NSCLC and colon carcinoma, also has therapeutic efficacy in chemoresistant, relapsed
336 SCLC (46) , as well as in extended disease SCLC improving progression-free survival
337 (47,48). Furthermore, a number of clinical trials have examined the efficacy of
338 bevacizumab in well-differentiated neuroendocrine tumors showing modest activity
339 (16,17). However, the number of studies evaluating anti-VEGF therapies in NEC is
340 scarcer and only assessing the efficacy of bevacizumab. So far, three xenograft models
341 derived from NEC cell lines has been published. One of this studies assessed the toxicity
342 and efficacy of radioimmunotherapy (RIT) combined with bevacizumab in mice
343 subcutaneously grafted with TT Medullary Thyroid Carcinoma cells, the authors
344 observed that pretreatment with bevacizumab improved RIT efficacy with similar
345 toxicity as compared as RIT alone (49). Kasuya et al. also carried out a study to evaluate
346 the antitumor effect of bevacizumab, using a pancreatic NEC cell lines compared with
347 two different pancreatic ductal cell carcinoma cell lines. They observed that
348 bevacizumab exerted the most marked growth-inhibitory effect on NEC cell lines and
349 suggested that bevacizumab could be a potent inhibitory effect on the growth of
350 pancreatic neuroendocrine tumors alone (50). Later, they compared the effect of
351 bevacizumab in combined therapy versus bevacizumab monotherapy and concluded

352 gemcitabine was appropriated as a drug to be used in combination with bevacizumab
353 for pancreatic neuroendocrine carcinomas (51). Moreover, the benefit of bevacizumab
354 has been also demonstrated in single patients diagnosed with NEC and treated with
355 bevacizumab plus modified FOLFOX6 (52) or temozolomide (30). But it has been used as
356 a monotherapy in patient with an iris carcinoma which had metastasized from a LCNEC
357 of the lung (53). To date, there is only one phase II study designed to evaluate the
358 efficacy of bevacizumab. This study is PRODIGE 41-BEVANEC and includes patients with
359 gastroenteropancreatic NEC and documented progressive disease during or after
360 cisplatin-etoposide in first-line palliative chemotherapy. The hypothesis is to
361 demonstrate a 6-month overall survival for at least 50% of the patients in bevacizumab
362 arm versus 35% in the control arm (FOLFIRI alone). The first patient was randomized on
363 September, 2017 and the study is currently opened (11). Our results point in the same
364 direction regarding the benefit of combined therapies with bevacizumab to treat NEC.
365 To our knowledge, this is the first study to evaluate aflibercept as alternative therapy in
366 NEC. In light of the robust findings derived from this in-depth preclinical proof of
367 concept, we emphasize the results derived from aflibercept study that could be the
368 starting point for further studies due to its promising efficacy in these tumor entities.
369 The tumor growth inhibition by aflibercept is unlikely be only due to decrease in VEGF
370 family members expression since both xenograft models show similar reduction of the
371 ligand levels whereas the antitumor activity seems to be stronger in LNEC than in
372 gastrointestinal NEC. Further studies are currently on going to investigate other
373 molecular mechanisms underlying the different observed response.
374 The results showed in this paper could be the starting point to evaluate the inclusion of
375 these antiangiogenics, especially aflibercept, in clinical trials for gastrointestinal and lung
376 NECs combined with the standard treatments.
377

378 **Statements**

379 **Acknowledgement**

380 The authors acknowledge to the Animal model has been carried out at the Animal
381 Model Core Facility of Research Health Institute – Fundación Jiménez Díaz
382 (ES28079000089).

383 **Statement of Ethics**

384 All animal procedures and experimental protocols were approved by the Ethical Animal
385 Research Committee at IIS-Fundacion Jimenez Diaz (Madrid, Spain) and were also
386 conducted according to institutional standards (Reference nº: PROEXP 024/15), which
387 fulfilled the requirements established by the Spanish government and the European
388 Community (RD 53/2003).

389 **Disclosure Statement**

390 The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as
391 prejudicing the impartiality of the research reported.

392 **Funding Sources**

393 This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public,
394 commercial or not-for-profit sector

References

1. Dasari A, Mehta K, Byers LA, Sorbye H, Yao JC. Comparative study of lung and extrapulmonary poorly differentiated neuroendocrine carcinomas: A SEER database analysis of 162,983 cases. *Cancer*. 2017 Dec 6;
2. Garcia-Carbonero R, Sorbye H, Baudin E, Raymond E, Wiedenmann B, Niederle B, et al. ENETS Consensus Guidelines for High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Neuroendocrine Carcinomas. *Neuroendocrinology*. 2016;103(2):186–94.
3. RV L, RY O, G K, J R. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs [Internet]. [cited 2019 Feb 4]. Available from: <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Who-Classification-Of-Tumours-Of-Endocrine-Organs-2017>
4. Öberg K, Hellman P, Ferolla P, Papotti M, ESMO Guidelines Working Group. Neuroendocrine bronchial and thymic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2012 Oct;23 Suppl 7:vii120-123.
5. Eads JR. Poorly Differentiated Neuroendocrine Tumors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016 Feb;30(1):151–62.
6. Grozinsky-Glasberg S, Shimon I, Rubinfeld H. The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*. 2012;96(3):173–87.
7. Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, et al. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Lond Engl*. 2016 Mar 5;387(10022):968–77.
8. Yao JC, Pavel M, Lombard-Bohas C, Van Cutsem E, Voi M, Brandt U, et al. Everolimus for the Treatment of Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Overall Survival and Circulating Biomarkers From the Randomized, Phase III RADIANT-3 Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016 Nov 10;34(32):3906–13.
9. Yazdani S, Kasajima A, Tamaki K, Nakamura Y, Fujishima F, Ohtsuka H, et al. Angiogenesis and vascular maturation in neuroendocrine tumors. *Hum Pathol*. 2014 Apr;45(4):866–74.
10. Naik A, Al-Zeheimi N, Bakheit CS, Al Riyami M, Al Jarrah A, Al Moundhri MS, et al. Neuropilin-1 Associated Molecules in the Blood Distinguish Poor Prognosis Breast Cancer: A Cross-Sectional Study. *Sci Rep*. 2017 Jun 12;7(1):3301.
11. Walter T, Malka D, Hentic O, Lombard-Bohas C, Le Malicot K, Smith D, et al. Evaluating bevacizumab in combination with FOLFIRI after the failure of platinum-etoposide regimen in patients with advanced poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: The PRODIGE 41-BEVANEC randomized phase II study. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2018 Feb;50(2):195–8.
12. Yao JC, Phan A, Hoff PM, Chen HX, Charansangavej C, Yeung S-CJ, et al. Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment phase II

study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon alpha-2b. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1316–23.

13. Kunz PL, Balise RR, Fehrenbacher L, Pan M, Venook AP, Fisher GA, et al. Oxaliplatin-Fluoropyrimidine Chemotherapy Plus Bevacizumab in Advanced Neuroendocrine Tumors: An Analysis of 2 Phase II Trials. *Pancreas*. 2016 Nov;45(10):1394–400.
14. Bendell JC, Zakari A, Lang E, Waterhouse D, Flora D, Alguire K, et al. A Phase II Study of the Combination of Bevacizumab, Pertuzumab, and Octreotide LAR for Patients with Advanced Neuroendocrine Cancers. *Cancer Invest*. 2016 May 27;34(5):213–9.
15. Kakuta S, Takayama W, Kou T, Satou M, Sugaya M. [A Case of Descending Colon Adenocarcinoma with Neuroendocrine Differentiation Successfully Treated with FOLFIRI plus Bevacizumab]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2016 Jan;43(1):129–32.
16. Yao JC, Guthrie KA, Moran C, Strosberg JR, Kulke MH, Chan JA, et al. Phase III Prospective Randomized Comparison Trial of Depot Octreotide Plus Interferon Alfa-2b Versus Depot Octreotide Plus Bevacizumab in Patients With Advanced Carcinoid Tumors: SWOG S0518. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 May 20;35(15):1695–703.
17. Kulke MH, Niedzwiecki D, Foster NR, Fruth B, Kunz PL, Kennecke HF, et al. Randomized phase II study of everolimus (E) versus everolimus plus bevacizumab (E+B) in patients (Pts) with locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors (pNET), CALGB 80701 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015 May 20;33(15_suppl):4005–4005.
18. Ricci V, Ronzoni M, Fabozzi T. Aflibercept a new target therapy in cancer treatment: a review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 Dec;96(3):569–76.
19. Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T, Abe M, Ikezono Y, Wada F, et al. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Aflibercept, a Soluble VEGF Receptor-1 and -2, in a Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma. *Neoplasia N Y N*. 2016 Jul;18(7):413–24.
20. Wu FTH, Paez-Ribes M, Xu P, Man S, Bogdanovic E, Thurston G, et al. Aflibercept and Ang1 supplementation improve neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in a preclinical model of resectable breast cancer. *Sci Rep*. 2016 14;6:36694.
21. Kim ES, Serur A, Huang J, Manley CA, McCrudden KW, Frischer JS, et al. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 20;99(17):11399–404.
22. Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, et al. Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Nov 15;9(15):5721–8.
23. Fukasawa M, Korc M. Vascular endothelial growth factor-trap suppresses tumorigenicity of multiple pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 May 15;10(10):3327–32.
24. Li H, Takayama K, Wang S, Shiraishi Y, Gotanda K, Harada T, et al. Addition of bevacizumab enhances antitumor activity of erlotinib against non-small cell lung cancer

- xenografts depending on VEGF expression. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Dec;74(6):1297–305.
25. Lal D, Park JA, Demock K, Marinaro J, Perez AM, Lin M-H, et al. Aflibercept exerts antivasular effects and enhances levels of anthracycline chemotherapy in vivo in human acute myeloid leukemia models. *Mol Cancer Ther*. 2010 Oct;9(10):2737–51.
 26. Corwin WL, Ebrahimi-Nik H, Floyd SM, Tavousi P, Mandoiu II, Srivastava PK. Tumor Control Index as a new tool to assess tumor growth in experimental animals. *J Immunol Methods*. 2017 Jun;445:71–6.
 27. Tang LH, Untch BR, Reidy DL, O'Reilly E, Dhall D, Jih L, et al. Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors with a Morphologically Apparent High-Grade Component: A Pathway Distinct from Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Feb 15;22(4):1011–7.
 28. Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albini A, Bresaola E, Marchiò C, et al. Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl Lung Cancer Res*. 2017 Oct;6(5):513–29.
 29. Tang LH, Basturk O, Sue JJ, Klimstra DS. A Practical Approach to the Classification of WHO Grade 3 (G3) Well-differentiated Neuroendocrine Tumor (WD-NET) and Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinoma (PD-NEC) of the Pancreas. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(9):1192–202.
 30. Welin S, Sorbye H, Sebjornsen S, Knappskog S, Busch C, Oberg K. Clinical effect of temozolomide-based chemotherapy in poorly differentiated endocrine carcinoma after progression on first-line chemotherapy. *Cancer*. 2011 Oct 15;117(20):4617–22.
 31. Terashima T, Morizane C, Hiraoka N, Tsuda H, Tamura T, Shimada Y, et al. Comparison of chemotherapeutic treatment outcomes of advanced extrapulmonary neuroendocrine carcinomas and advanced small-cell lung carcinoma. *Neuroendocrinology*. 2012;96(4):324–32.
 32. Yamaguchi T, Machida N, Morizane C, Kasuga A, Takahashi H, Sudo K, et al. Multicenter retrospective analysis of systemic chemotherapy for advanced neuroendocrine carcinoma of the digestive system. *Cancer Sci*. 2014 Sep;105(9):1176–81.
 33. Iwasa S, Morizane C, Okusaka T, Ueno H, Ikeda M, Kondo S, et al. Cisplatin and etoposide as first-line chemotherapy for poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of the hepatobiliary tract and pancreas. *Jpn J Clin Oncol*. 2010 Apr;40(4):313–8.
 34. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013 Jan;24(1):152–60.
 35. Hainsworth JD, Spigel DR, Litchy S, Greco FA. Phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and etoposide in advanced poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: a Minnie Pearl Cancer Research Network Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Aug 1;24(22):3548–54.

36. Iyoda A, Makino T, Koezuka S, Otsuka H, Hata Y. Treatment options for patients with large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Jun;62(6):351–6.
37. Sun J-M, Ahn M-J, Ahn JS, Um S-W, Kim H, Kim HK, et al. Chemotherapy for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma: similar to that for small cell lung cancer or non-small cell lung cancer? *Lung Cancer Amst Neth*. 2012 Aug;77(2):365–70.
38. Han K, Yang H, Fan L, Zhao H. Outcomes of patients with large cell neuroendocrine carcinoma of the lung after complete resection. *Transl Cancer Res*. 2017 Jun 9;6(3):483–92.
39. Varlotto JM, Medford-Davis LN, Recht A, Flickinger JC, Schaefer E, Zander DS, et al. Should large cell neuroendocrine lung carcinoma be classified and treated as a small cell lung cancer or with other large cell carcinomas? *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2011 Jun;6(6):1050–8.
40. Eba J, Kenmotsu H, Tsuboi M, Niho S, Katayama H, Shibata T, et al. A Phase III trial comparing irinotecan and cisplatin with etoposide and cisplatin in adjuvant chemotherapy for completely resected pulmonary high-grade neuroendocrine carcinoma (JCOG1205/1206). *Jpn J Clin Oncol*. 2014 Apr;44(4):379–82.
41. Abdel-Rahman O. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway and neuroendocrine neoplasms (NENs): prognostic and therapeutic considerations. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2014 Nov;35(11):10615–25.
42. Quinn LA, Moore GE, Morgan RT, Woods LK. Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Res*. 1979 Dec;39(12):4914–24.
43. Sunday ME, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S, Willett CG. Altered growth of a human neuroendocrine carcinoma line after transfection of a major histocompatibility complex class I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jun;86(12):4700–4.
44. Piao Y, Guo H, Qu Z, Zheng B, Gao Y. CD146 promotes migration and proliferation in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma cell lines. *Oncol Lett*. 2019 Feb;17(2):2075–80.
45. Zhao Y, Yu D, Wu H, Liu H, Zhou H, Gu R, et al. Anticancer activity of SAHA, a potent histone deacetylase inhibitor, in NCI-H460 human large-cell lung carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 2014 Feb;44(2):451–8.
46. Lu H, Jiang Z. Advances in antiangiogenic treatment of small-cell lung cancer. *Oncotargets Ther*. 2017;10:353–9.
47. Tiseo M, Boni L, Ambrosio F, Camerini A, Baldini E, Cinieri S, et al. Italian, Multicenter, Phase III, Randomized Study of Cisplatin Plus Etoposide With or Without Bevacizumab as First-Line Treatment in Extensive-Disease Small-Cell Lung Cancer: The GOIRC-AIFA FARM6PMFJM Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Apr 20;35(12):1281–7.
48. Pujol J-L, Lavole A, Quoix E, Molinier O, Souquet P-J, Barlesi F, et al. Randomized phase II-III study of bevacizumab in combination with chemotherapy in previously untreated

extensive small-cell lung cancer: results from the IFCT-0802 trial†. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015 May;26(5):908–14.

49. Salaun P-Y, Bodet-Milin C, Frampas E, Oudoux A, Sai-Maurel C, Faivre-Chauvet A, et al. Toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and bevacizumab in a mouse model of medullary thyroid carcinoma. *Cancer*. 2010 Feb 15;116(4 Suppl):1053–8.
50. Kasuya K, Nagakawa Y, Suzuki M, Tanaka H, Ohta H, Itoi T, et al. Anti-vascular endothelial growth factor antibody single therapy for pancreatic neuroendocrine carcinoma exhibits a marked tumor growth-inhibitory effect. *Exp Ther Med*. 2011 Nov;2(6):1047–52.
51. Kasuya K, Nagakawa Y, Suzuki M, Suzuki Y, Kyo B, Suzuki S, et al. Combination therapy of gemcitabine or oral S-1 with the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab for pancreatic neuroendocrine carcinoma. *Exp Ther Med*. 2012 Apr;3(4):599–602.
52. Takeuchi S, Honma R, Taguchi J, Amano T, Shimizu Y, Kinoshita I, et al. A Case of High-Grade Neuroendocrine Carcinoma That Improved with Bevacizumab plus Modified FOLFOX6 as the Fourth-Line Chemotherapy. *Case Rep Oncol*. 2011 May;4(2):260–6.
53. Yokouchi H, Kitahashi M, Oshitari T, Yamamoto S. Intravitreal bevacizumab for iris tumor metastasized from large cell neuroendocrine carcinoma of lung. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 2013 Sep;251(9):2243–5.

Figure Legends

Fig. 1. Immunohistochemical analysis and macroscopic images of xenograft tumors derived from H460 and COLO320 cell lines. A) Both xenograft models show extensive tumor necrosis, positivity for neuroendocrine carcinoma markers, Chromogranin A, Synaptophysin and for p53, and high proliferative index (Ki67 labeling) (X400). **B)** Macroscopically images of the tumors represent the overall average size for each group. Treated tumors were smaller and less irrigated compared to control group supporting the antitumor activity of bevacizumab and aflibercept.

Fig. 2. Tumor growth inhibition. Antitumor effects of both drugs are shown. Treatments were as follow: control (normal saline); bevacizumab (5mg/kg) and aflibercept (25mg/kg). Each point on line graph represents the mean of tumor volume (mm^3) at a particular day after implantation (each three days during three weeks). Bars represent SD. **A)** Changes in the mean of tumor volume over the time course of the experiment in H460 xenograft model. **B)** Changes in the mean of tumor volume over the time course of the experiment in COLO320 xenograft model. Control tumors (n=12 per each xenograft model), aflibercept tumors (n=9 for H460, n=8 for COLO320) and bevacizumab tumors (n=9 for H460, n=7 for COLO320). ** $P < 0.001$ versus the control group.

Fig. 3. Analysis of antitumor activity in early and late phases of treatments. Aflibercept and bevacizumab showed antitumor activity both in the early and late phase when they were compared to control group. **A)** H460 xenograft model. **B)** COLO320 xenograft model. Control tumors (n=12 per each xenograft model), aflibercept tumors (n=9 for H460, n=8 for COLO320) and bevacizumab tumors (n=9 for H460, n=7 for COLO320). Data points show mean \pm SD of tumor volume. Control, open circles; aflibercept, closed black circles; bevacizumab, closed grey circles ** $P < 0.001$; * $P < 0.05$

Fig. 4. Induction of complete tumor stasis. Tumor growth inhibition (ΔT /median ΔC) induced by aflibercept and bevacizumab was plotted for all mice. **A)** Aflibercept induced complete tumor stasis in 6 out of 9 tumors in H460 xenograft model. **B)** COLO320 xenograft model showed no significant differences between treatments and none of them induced stasis. Control tumors (n=12 per each xenograft model), aflibercept

tumors (n=9 for H460, n=8 for COLO320) and bevacizumab tumors (n=9 for H460, n=7 for COLO320).

Fig. 5. Total TCI Score. Total TCI scores of COLO320 and H460 tumors in mice treated with aflibercept and bevacizumab are shown. **A)** H460 xenograft model. **B)** COLO320 xenograft model. Control tumors (n=12 per each xenograft model), aflibercept tumors (n=9 for H460, n=8 for COLO320) and bevacizumab tumors (n=9 for H460, n=7 for COLO320). Each bar shows the average total TCI score for the indicated treatment group. ** P<0.001; * P<0.05

Fig. 6. TCI Stability Score. TCI stability scores of xenograft tumors derived from H460 or COLO320 lines treated with aflibercept and bevacizumab are shown. **A)** H460 xenograft model. **B)** COLO320 xenograft model. Control tumors (n=12 per each xenograft model), aflibercept tumors (n=9 for H460, n=8 for COLO320) and bevacizumab tumors (n=9 for H460, n=7 for COLO320). Each bar shows the average TCI stability score for the indicated treatment group. ** P<0.001; * P<0.05

Fig. 7. Antiangiogenic effect of aflibercept and bevacizumab. Analysis of VEGF family protein levels in xenograft tumors derived from H460 or COLO320 cell lines treated with aflibercept or bevacizumab. **A)** Relative VEGF-A protein expression determined by ELISA in tumors from both xenograft models. **B)** Representative images of VEGF-B and PIGF protein levels determined by western blot in tumors from H460 and COLO320 xenograft model. B-actin was used as internal control.

Table 1. Summary of study design, neuroendocrine characteristics of xenograft tumors and results of antitumor activity

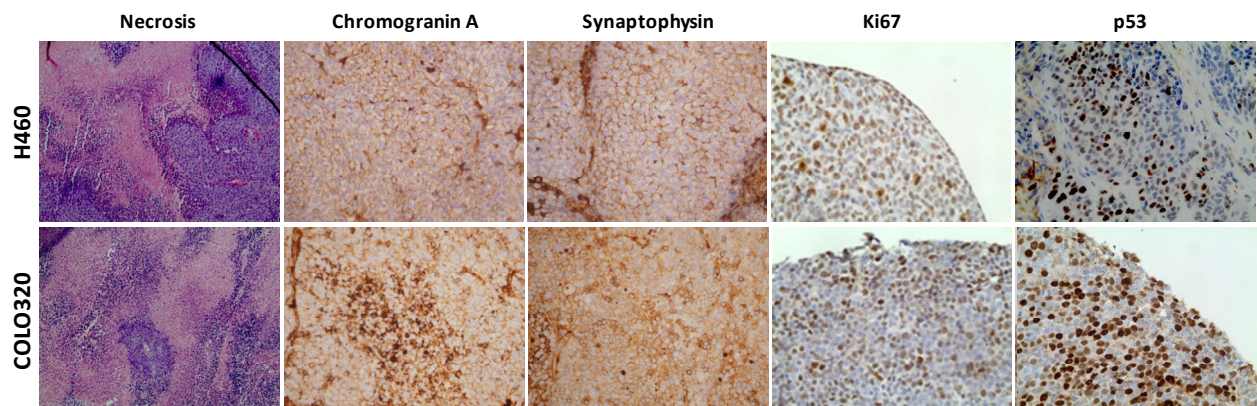
	H460	COLO320
Mice (n)	18	18
Control (n)	6	6
Aflibercept (n)	6	6
Bevacizumab (n)	6	6
Xenograft tumors (n)	36	32
NE Markers		
CgA	Positive	Positive
Synp	Positive	Positive
Ki67 (%)	86	78
p53 (%)	37	53.7
Growth inhibition (%)*		
Aflibercept	94	89.3
Bevacizumab	72.7	84.1
Tumor arrest (%)*		
Aflibercept	0.65	5.52
Bevacizumab	21.84	8.13
Total score – TCI*		
Aflibercept	12.03	11.64
Bevacizumab	8.38	10.5

NE, neuroendocrine

* Analysis of antitumor activity were calculated comparing treated groups *versus* control group

Figure 1

A



B

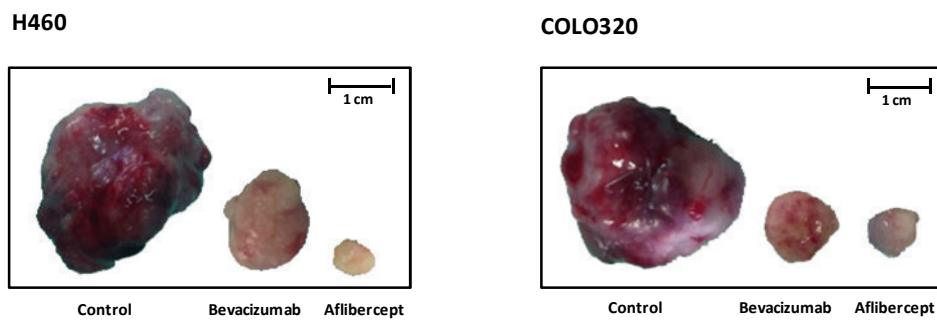
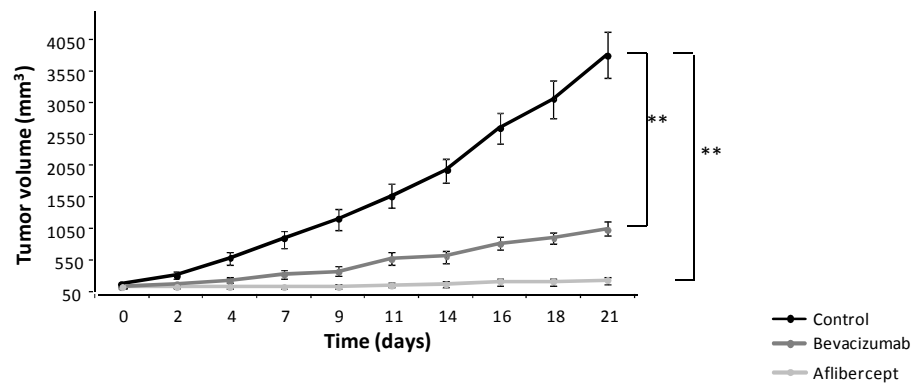


Figure 2

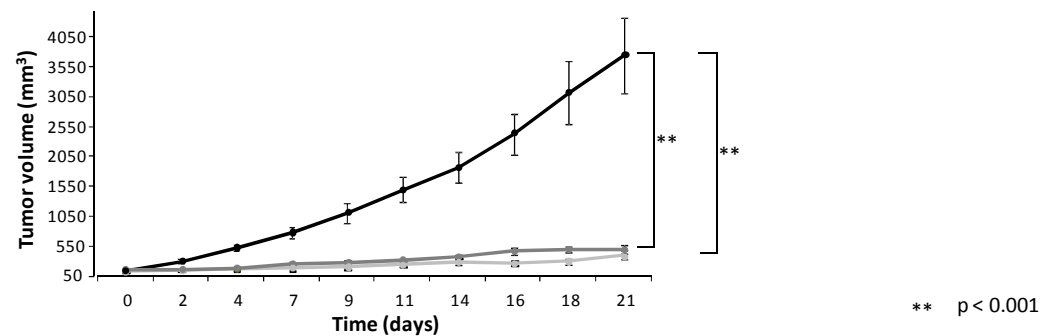
A

H460



B

COLO320



** p < 0.001

Figure 3

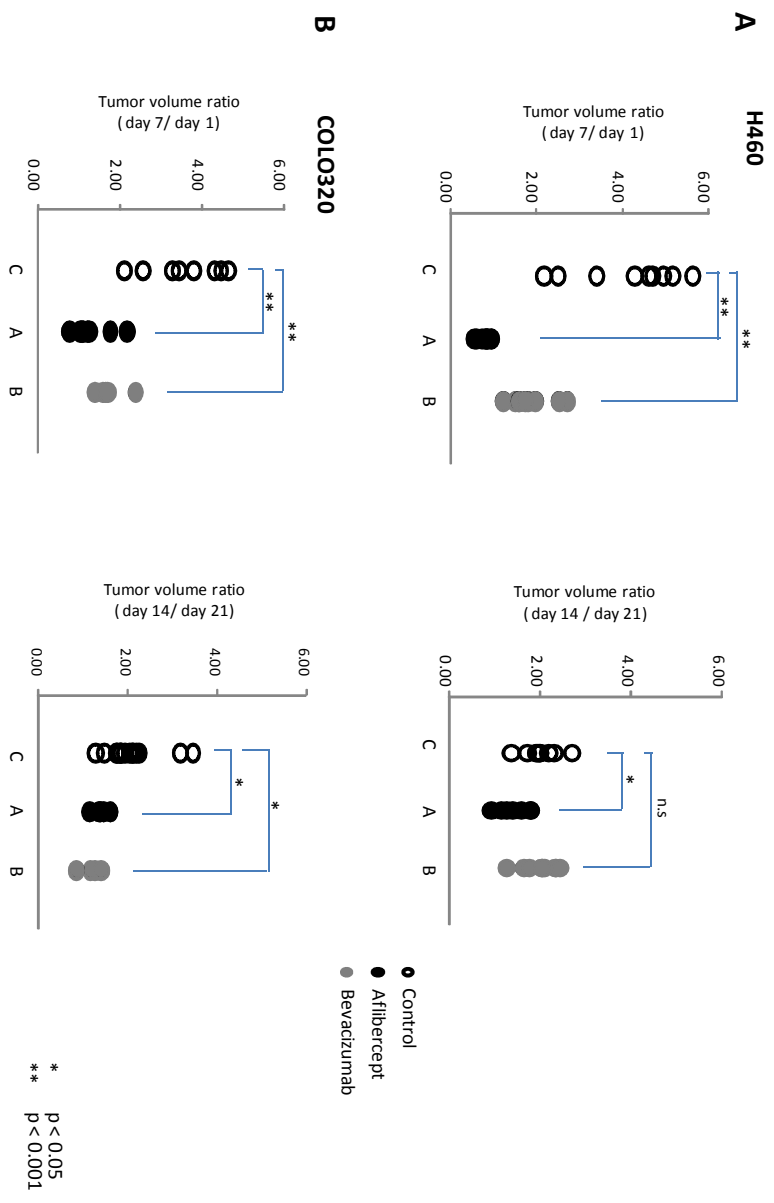


Figure 4

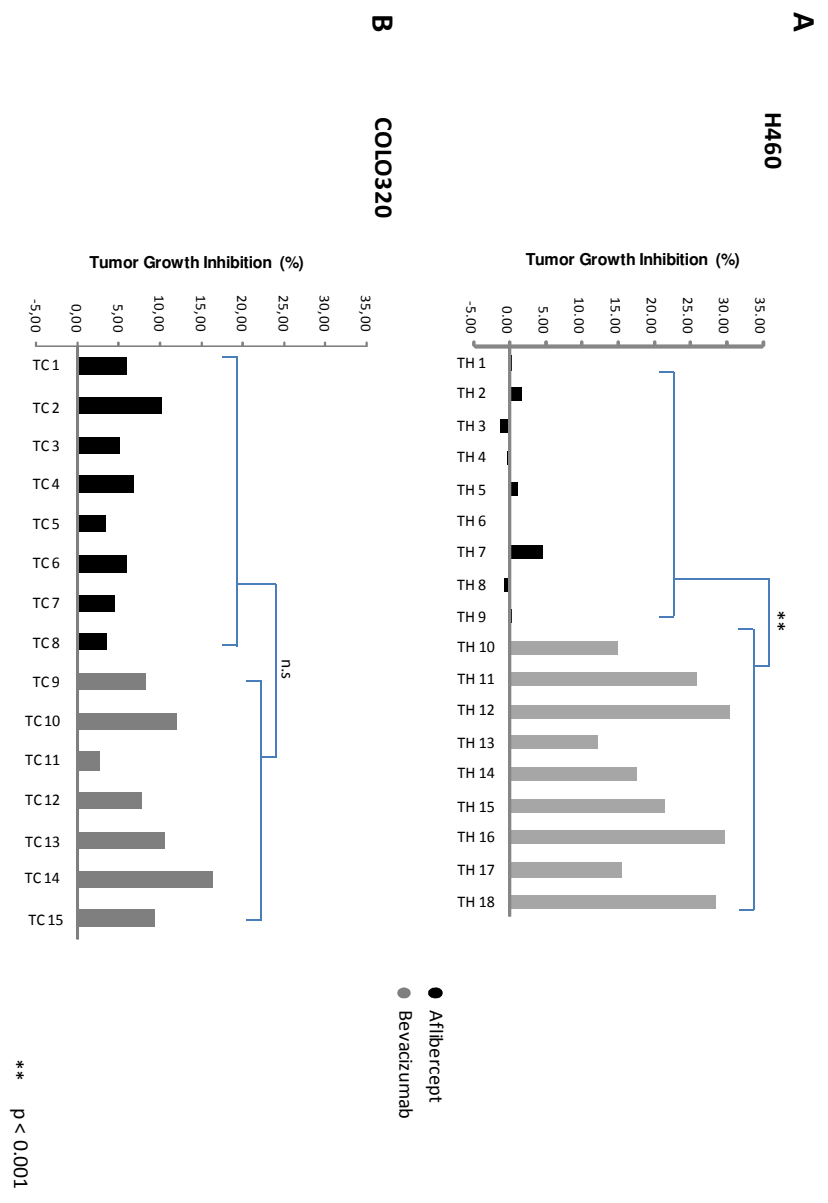
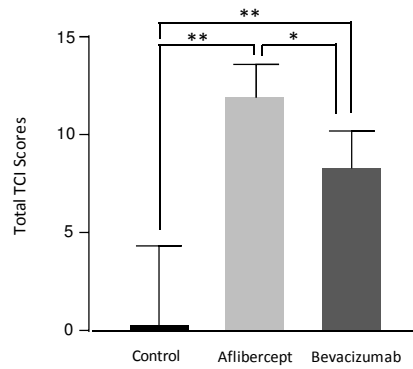


Figure 5

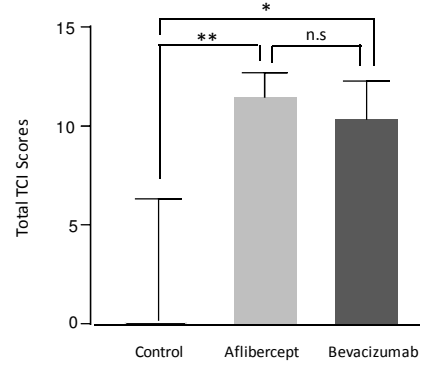
A

H460



B

COLO320

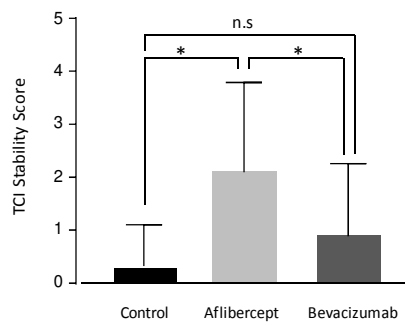


* p < 0.05
** p < 0.001

Figure 6

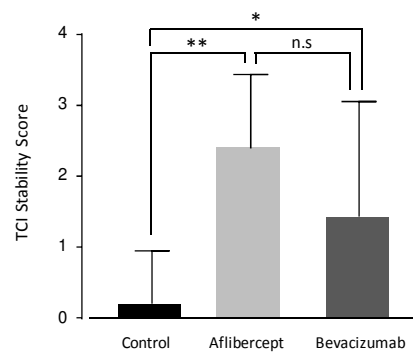
A

H460



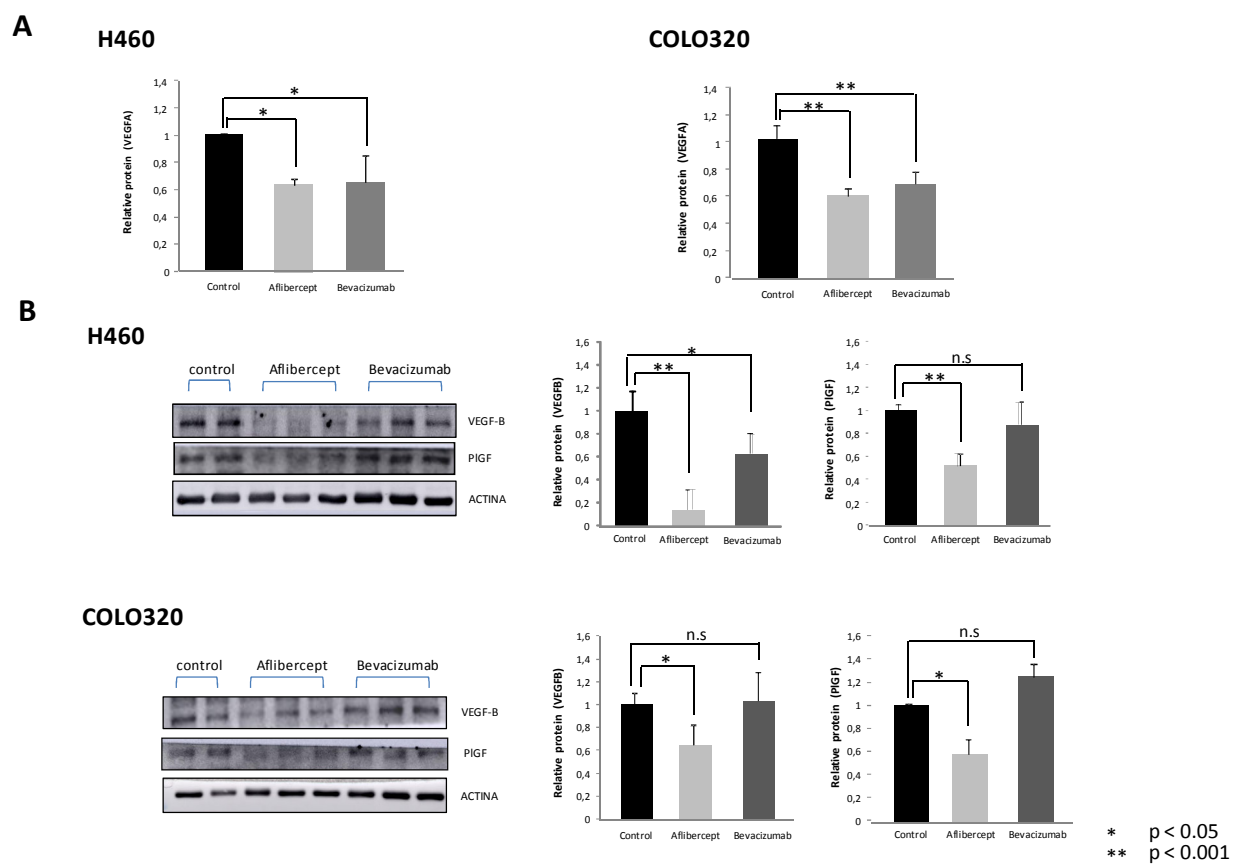
B

COLO320



* p < 0.05
** p < 0.001

Figure 7



SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

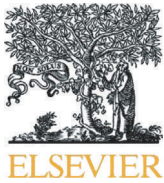
Combination of KIR2DS4 and *FcγR11a* polymorphisms predicts the response to cetuximab in *KRAS* mutant metastatic colorectal cancer

A. Borrero-Palacios¹, A. Cebrián¹, M. T. Gómez del Pulgar¹, R. García-Carbonero², P. García³, E. Aranda⁴, E. Elez⁵, R. López-López⁶, A. Cervantes⁷, M. Valladares⁸, C. Nadal⁹, J. M. Viéitez¹⁰, C. Guillén-Ponce¹¹, J. Rodríguez¹², I. Hernández¹³, J. L. García¹⁴, R. Vega-Bravo¹⁵, A. Puime-Otin¹⁵, J. Martínez-Useros¹, L. Del Puerto-Nevado¹, R. Rincón¹, M. Rodríguez-Remírez¹, F. Rojo¹⁵ & J. García-Foncillas¹

Cetuximab is a standard-of-care treatment for *RAS* wild-type metastatic colorectal cancer (mCRC) but not for those harbor a *KRAS* mutation since MAPK pathway is constitutively activated. Nevertheless, cetuximab also exerts its effect by its immunomodulatory activity despite the presence of *RAS* mutation. The aim of this study was to determine the impact of polymorphism *FcγR11a* V158F and killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genes on the outcome of mCRC patients with *KRAS* mutations treated with cetuximab. This multicenter Phase II clinical trial included 70 mCRC patients with *KRAS* mutated. We found *KIR2DS4* gene was significantly associated with OS (HR 2.27; 95% CI, 1.08–4.77; $P = 0.03$). In non-functional receptor homozygotes the median OS was 2.6 months longer than in carriers of one copy of full receptor. Multivariate analysis confirmed *KIR2DS4* as a favorable prognostic marker for OS (HR 6.71) in mCRC patients with *KRAS* mutation treated with cetuximab. These data support the potential therapeutic of cetuximab in *KRAS* mutated mCRC carrying non-functional receptor *KIR2DS4* since these patients significantly prolong their OS even after heavily treatment. *KIR2DS4* typing could be used as predictive marker for identifying *RAS* mutated patients that could benefit from combination approaches of anti-EGFR monoclonal antibodies and other immunotherapies to overcome the resistance mediated by mutation in *RAS*.

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and the second most common in Europe with 447,136 new cases in 2012¹. Specifically in Spain the incidence was 32,240 new cases. If trends continue by December 31, 2020, Spain will have approximately 37,229 new CRC cases². Approximately 20% of patients present metastatic disease (mCRC) at diagnosis³.

¹Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Hospital Universitario "Fundación Jimenez Diaz", Madrid, Spain. ²Medical Oncology Department, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain. ³Medical Oncology Department, Hospital Gral. Univ. Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ⁴Medical Oncology Department, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain. ⁵Medical Oncology Department, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain. ⁶Medical Oncology Department, Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela, Galicia, Spain. ⁷Medical Oncology Department, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain. ⁸Medical Oncology Department, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Galicia, Spain. ⁹Medical Oncology Department, Hospital Clínic Provincial de Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁰Medical Oncology Department, Hospital Universitario Central de Asturias, Asturias, Spain. ¹¹Medical Oncology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. ¹²Medical Oncology Department, Clínica Universitaria de Navarra, Navarra, Spain. ¹³Medical Oncology Department, Complejo Hospitalario de Navarra, Navarra, Spain. ¹⁴Oncology, Medical Unit, Merck S.L, an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. ¹⁵Anatomopathology Department, Hospital Universitario "Fundación Jimenez Diaz", Madrid, Spain. A. Borrero-Palacios and A. Cebrián contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.C. (email: aranca.cebrian@oncohealth.eu) or J.G.-F. (email: jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Geriatric Oncology



Prognostic significance of neutrophil-to lymphocyte ratio and platelet-to lymphocyte ratio in older patients with metastatic colorectal cancer

Marlid Cruz-Ramos^{a,1}, Laura del Puerto-Nevado^{a,*,1}, Binbin Zheng^{a,b}, Rafael López-Bajo^{a,c}, Arancha Cebrian^a, María Rodríguez-Remírez^a, Laura García-García^a, Sonia Solanes-Casado^a, Jesús García-Foncillas^a

^a Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, IIS-Fundación Jimenez Diaz-UAM, Madrid 28030, Spain

^b Department of Internal Medicine, Mount Sinai St. Luke's West Hospital, New York, NY 10025, USA

^c Oncology Department, Hospital Mancha Centro, 13600 Alcázar de San Juan, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2018

Received in revised form 19 September 2018

Accepted 5 October 2018

Available online xxx

Keywords:

Older

Metastatic colorectal cancer

Neutrophil-to-lymphocyte ratio

NLR

Platelet-to-lymphocyte ratio

PLR

Prognostic

Predictive

Biomarker

ABSTRACT

Aging is associated with a higher risk of cancer, >70% of cancer-related deaths occur in aged patients; however, this population is underrepresented in clinical trials, therefore, clinical information regarding this age group is rather limited.

Objectives: Neutrophil-to lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to lymphocyte ratio (PLR) have been described as biomarkers in cancer, thus, we have assessed their impact in an aged cohort of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC).

Patients and Methods: 110 patients with a mean age of 72.2 years at diagnosis were retrospectively reviewed; NLR and PLR were calculated and dichotomized using a cutoff point estimated by a ROC curve. Survival curves and Cox regression analysis were performed to assess the prognostic potential of ratios in terms of progression free survival (PFS) and overall survival (OS).

Results: High NLR was associated to worse outcome in terms of PFS (ten vs sixteen months; Log rank <0.001) (HR 2.00 95%CI 1.29–3.11; $p = .002$) and OS (20 vs 26 months; Log rank 0.002) (HR 2.28 95%CI 1.40–3.71; $p = .001$). Similarly it occurs with high PLR and PFS (nine vs fifteen months; Log rank 0.04) (HR 1.55 95%CI 1.01–2.40; $p = .04$) and OS (nineteen vs 25 months; Log rank <0.001) (HR 2.35 95%CI 1.45–3.80; $p < .001$).

Conclusion: This study confirms the role of NLR and PLR as accessible and noninvasive biomarkers that could be use as a routine tool in the clinical practice in geriatric patients with mCRC.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aged population is growing importantly around the world. New medical advances generate not only chances to live longer [1], but also increase the risk of having diseases such as cancer, resulting in an aged population requiring specific medical care [2]. This current situation implies a public health problem; in comparison to young population, older oncologic patients have more co morbidities and fragility, which means they require a specific care, but reported data are poor given that older patients are underrepresented in clinical trials [3]. As such, clinical information in this age group is limited. Based on available data, it has been reported that these patients have poorer outcome in terms of survival and suboptimal management [4].

In Western countries, the mean age for colorectal cancer (CRC) diagnosis is 70 years old; the 70% of the CRC cases occurs in patients over the

age of 65 years and, in this age group, 40% are 75 years or older [5,6]. Older patients have an increased risk for toxicity derived from cancer therapy and the standard method used to determine this risk is usually based on geriatric assessment (GA) [7,8]. GA evaluation can also impact in treatment tolerability and survival [9]. However, despite the strong evidence of the value of GA in oncology practice [10], it is unknown whether biomarkers could complement patients' evaluation [11]. Hence, it makes important to find an easy-to-measure marker for use in daily clinical practice for this population group that may complement GA, or support clinical decisions in cases were GA is not available.

Tumor and inflammation interactions are complex and involve different processes related with carcinogenesis, such as tumor initiation, angiogenesis, apoptosis inhibition and metastasis [12–14]. Blood-based parameters can measure changes in systemic inflammatory response. For example indexes as C-reactive protein (CRP), modified Glasgow Prognostic Score (mGPS), neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet to-lymphocyte ratio (PLR) have been studied as biomarkers in patients with cancer [15–19]. The relation of NLR, as well as PLR, with poor prognostic has been reported in different tumors [20,21].

* Corresponding author.

E-mail address: lpuerto@oncohealth.eu (L. del Puerto-Nevado).

¹ Equal contribution.

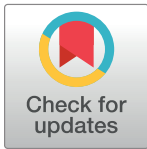
RESEARCH ARTICLE

UNR/*CDSE1* expression as prognosis biomarker in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma patients: A proof-of-concept

Javier Martinez-Useros^{1*}, Tihomir Georgiev-Hristov², María Jesús Fernández-Aceñero³, Aurea Borrero-Palacios¹, Alberto Indacochea^{4,5}, Santiago Guerrero^{4,6}, Weiyao Li¹, Arancha Cebrián¹, Teresa Gómez del Pulgar¹, Alberto Puime-Otin⁷, Laura del Puerto-Nevado¹, María Rodríguez-Remírez¹, Nuria Pérez⁷, Angel Celdrán⁸, Fátima Gebauer^{4,6}, Jesus Garcia-Foncillas^{1*}

1 Translational Oncology Division, OncoHealth Institute, University Hospital Fundacion Jimenez Diaz (FJD), Madrid, Spain, **2** Surgery Department, Hospital de Villalba, Collado-Villalba, Spain, **3** Department of Pathology, Clinico San Carlos University Hospital, C/ Profesor Martin Lagos, Madrid, Spain, **4** Gene Regulation, Stem Cells and Cancer Programme, Centre for Genomic Regulation (CRG), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain, **5** Oncology and Molecular Pathology Research Group-VHIR- Vall d' Hebron Institut de Recerca-Vall d' Hebron Hospital, P/ de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, **6** Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain, **7** Department of Pathology, University Hospital Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain, **8** Hepatobiliary and Pancreatic Surgery Unit, General and Digestive Tract Surgery Department, Fundacion Jimenez Diaz University Hospital, Madrid, Spain

* javier.museros@oncohealth.eu(JMU); jgfoncillas@gmail.com (JGF)



OPEN ACCESS

Citation: Martinez-Useros J, Georgiev-Hristov T, Fernández-Aceñero MJ, Borrero-Palacios A, Indacochea A, Guerrero S, et al. (2017) UNR/*CDSE1* expression as prognosis biomarker in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma patients: A proof-of-concept. PLoS ONE 12(8): e0182044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182044>

Editor: Martin Fernandez-Zapico, Mayo Clinic Rochester, UNITED STATES

Received: January 11, 2017

Accepted: July 11, 2017

Published: August 1, 2017

Copyright: © 2017 Martinez-Useros et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work has been carried out with the support of the RNA-Reg CONSOLIDER Network CSD2009-00080 (J.M.-U. and J.G.-F.), and Spanish Health Research Project Funds PI16/01468 from “Instituto de Salud Carlos III” (A.C. and J.G.-F.), both of the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness.

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma is an aggressive form of pancreatic cancer and the fourth leading cause of cancer-related death. When possible, curative approaches are based on surgical resection, though not every patient is a candidate for surgery. There are clinical guidelines for the management of these patients that offer different treatment options depending on the clinical and pathologic characteristics. However, the survival rates seen in this kind of patients are still low. The *CDSE1* gene is located upstream of *NRAS* and encodes an RNA-binding protein termed UNR. The aim of this study was to analyze UNR expression and its correlation with outcome in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). For this, samples from resectable PDAC patients who underwent duodenopancreatectomy were used to evaluate UNR protein expression by immunohistochemistry using a tissue microarray. Here, we observed that low UNR expression was significantly associated with shorter progression-free survival after surgery ($P = 0.010$). Moreover, this prognostic marker remained significant after Cox proportional hazards model ($P = 0.036$). We further studied the role of *CDSE1* expression in patient's prognosis using data from public repositories (GEO and TGCA), confirming our results. Interestingly, *CDSE1* expression correlated with that of genes characteristic of an immunogenic molecular subtype of pancreatic cancer. Based on these findings, UNR may be considered a potential prognostic biomarker for resectable PDAC and may serve to guide subsequent adjuvant treatment decisions.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The potential predictive value of DEK expression for neoadjuvant chemoradiotherapy response in locally advanced rectal cancer

J. Martinez-Useros^{1*}, I. Moreno¹, M. J. Fernandez-Aceñero², M. Rodriguez-Remirez¹, A. Borrero-Palacios¹, A. Cebrian¹, T. Gomez del Pulgar¹, L. del Puerto-Nevalo¹, W. Li¹, A. Puime-Otin³, N. Perez³, M. S. Soengas⁴ and J. Garcia-Foncillas^{1*}

Abstract

Background: Limited data are available regarding the ability of biomarkers to predict complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. Complete response translates to better patient survival. DEK is a transcription factor involved not only in development and progression of different types of cancer, but is also associated with treatment response. This study aims to analyze the role of DEK in complete pathological response following chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer.

Methods: Pre-treated tumour samples from 74 locally advanced rectal-cancer patients who received chemoradiation therapy prior to total mesorectal excision were recruited for construction of a tissue microarray. DEK immunoreactivity from all samples was quantified by immunohistochemistry. Then, association between positive stained tumour cells and pathologic response to neoadjuvant treatment was measured to determine optimal predictive power.

Results: DEK expression was limited to tumour cells located in the rectum. Interestingly, high percentage of tumour cells with DEK positiveness was statistically associated with complete pathological response to neoadjuvant treatment based on radiotherapy and fluoropyrimidine-based chemotherapy and a marked trend toward significance between DEK positiveness and absence of treatment toxicity. Further analysis revealed an association between DEK and the pro-apoptotic factor P38 in the pre-treated rectal cancer biopsies.

Conclusions: These data suggest DEK as a potential biomarker of complete pathological response to treatment in locally advanced rectal cancer.

Keywords: DEK, Chemoradiotherapy, Neoadjuvant treatment, Rectal cancer, Predictive biomarker, Complete pathological response

Background

Colorectal cancer is one of the most common gastrointestinal malignant tumours in the world and has one of the highest rates of morbidity and mortality worldwide. It is not only the third most common malignancy in United States but also the third leading cause of cancer-related deaths [1]. Rectal cancer accounts for between 27% and

58% of all cases of colorectal cancer, with variations attributable to the cancer registry studied and the method used to classify rectosigmoid tumours [2]. Of the 304,930 new cases of digestive-tract cancer diagnosed in 2016 in the United States, 39,220 were rectal, with higher incidence seen among males than females (23,110 vs. 16,110) [1]. Further information about the global incidence of rectal cancer can be obtained from the World Health Organization (WHO)-GLOBOCAN [3, 4].

A distinction must be made between rectal and colon carcinoma, as rectal cancer has a distinct dissemination pattern. Furthermore, surgical resection is the mainstay


* Correspondence: javier.museros@oncohealth.eu; jgfoncillas@gmail.com; jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu

¹Translational Oncology Division, OncoHealth Institute, Health Research Institute - University Hospital "Fundación Jiménez Díaz"-UAM, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Functional PTGS2 polymorphism-based models as novel predictive markers in metastatic renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib

Received: 10 August 2016
Accepted: 25 November 2016
Published: 24 January 2017

Arancha Cebrián^{1,*}, Teresa Gómez del Pulgar^{1,*}, María José Méndez-Vidal², María Luisa González³, Nuria Lainez⁴, Daniel Castellano⁵, Iciar García-Carbonero⁶, Emilio Esteban⁷, María Isabel Sáez⁸, Rosa Villatoro⁹, Cristina Suárez¹⁰, Alfredo Carrato¹¹, Javier Munárriz-Ferrándiz¹², Laura Basterrechea¹³, Mirta García-Alonso¹⁴, José Luis González-Larriba¹⁵, Begoña Perez-Valderrama¹⁶, Josefina Cruz-Jurado¹⁷, Aránzazu González del Alba¹⁸, Fernando Moreno¹⁹, Gaspar Reynolds²⁰, María Rodríguez-Remírez¹, Valentina Boni²¹, Ignacio Mahillo-Fernández¹, Yolanda Martín²², Andrea Viqueira²³ & Jesús García-Foncillas¹

Sunitinib is the currently standard treatment for metastatic renal cell carcinoma (mRCC). Multiple candidate predictive biomarkers for sunitinib response have been evaluated but none of them has been implemented in the clinic yet. The aim of this study was to analyze single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes linked to mode of action of sunitinib and immune response as biomarkers for mRCC. This is a multicenter, prospective and observational study involving 20 hospitals. Seventy-five mRCC patients treated with sunitinib as first line were used to assess the impact of 63 SNPs in 31 candidate genes on clinical outcome. rs2243250 (IL4) and rs5275 (PTGS2) were found to be significantly associated with shorter cancer-specific survival (CSS). Moreover, allele C (rs5275) was associated with higher PTGS2 expression level confirming its functional role. Combination of rs5275 and rs7651265 or rs2243250 for progression free survival (PFS) or CSS, respectively, was a more valuable predictive biomarker remaining significant after correction for multiple testing. It is the first time that association of rs5275 with survival in mRCC patients is described. Two-SNP models containing this functional variant may serve as more predictive biomarkers for sunitinib and could suppose a clinically relevant tool to improve the mRCC patient management.

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney cancer worldwide¹. Approximately 25% of patients will have metastatic disease at presentation² and, despite an attempted curative surgery, around 20–30% of patients will recur¹. Over the last years, the clarification of molecular mechanisms has transformed its management.

¹Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Madrid, Spain. ²Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain. ³Virgen de la Arrixaca University Hospital, Murcia, Spain. ⁴Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Spain. ⁵12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain. ⁶Virgen de la Salud University Hospital, Toledo, Spain. ⁷Central University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain. ⁸Virgen de la Victoria University Hospital, Málaga, Spain. ⁹Hospital Costa del Sol, Marbella, Spain. ¹⁰Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain. ¹¹Ramon y Cajal University Hospital, Madrid, Spain. ¹²Hospital Provincial de Castellón, Castellón, Spain. ¹³Hospital de Donostia, San Sebastian, Spain. ¹⁴Insular de Gran Canaria University Hospital, Islas Canarias, Spain. ¹⁵Clinico San Carlos University Hospital, Madrid, Spain. ¹⁶Virgen del Rocío University Hospital, Sevilla, Spain. ¹⁷Canarias University Hospital, Santa Cruz de Tenerife, Islas Canarias, Spain. ¹⁸Son Espases University Hospital, Palma de Mallorca, Spain. ¹⁹Fuenlabrada University Hospital, Fuenlabrada, Spain. ²⁰La Fe University Hospital, Valencia, Spain. ²¹Center for Applied Medical Research, Pamplona, Spain. ²²Trial Form Support, Madrid, Spain. ²³Pfizer Oncology, Madrid, Spain. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.G.F. (email: jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu)

Vitamin C uncouples the Warburg metabolic switch in KRAS mutant colon cancer

Oscar Aguilera¹, María Muñoz-Sagastibelza¹, Blanca Torrejón¹, Aurea Borrero-Palacios¹, Laura del Puerto-Nevado¹, Javier Martínez-Useros¹, María Rodríguez-Remírez¹, Sandra Zazo¹, Estela García^{2,3}, Mario Fraga^{2,3}, Federico Rojo¹, Jesús García-Foncillas¹

¹Cancer Biomarkers Research Group, Fundacion Jimenez Diaz University Hospital Health Research Institute, UAM, 28040 Madrid, Spain

²Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Fundacion Jimenez Diaz University Hospital, 28040 Madrid, Spain

³Cancer Epigenetics Laboratory, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA-HUCA), Universidad de Oviedo, 33011 Oviedo, Spain

Correspondence to: Federico Rojo, **email:** frojo@fjd.es
Jesús García-Foncillas, **email:** jgfoncillas@idcsalud.es

Keywords: colon cancer, Warburg, vitamin C, GLUT-1

Received: March 30, 2016

Accepted: May 29, 2016

Published: June 15, 2016

ABSTRACT

KRAS mutation is often present in many hard-to-treat tumors such as colon and pancreatic cancer and it is tightly linked to serious alterations in the normal cell metabolism and clinical resistance to chemotherapy.

In 1931, the winner of the Nobel Prize in Medicine, Otto Warburg, stated that cancer was primarily caused by altered metabolism interfering with energy processing in the normal cell. Increased cell glycolytic rates even in the presence of oxygen is fully recognized as a hallmark in cancer and known as the Warburg effect.

In the late 1970's, Linus Pauling and Ewan Cameron reported that vitamin C may have positive effects in cancer treatment, although deep mechanistic knowledge about this activity is still scarce.

We describe a novel antitumoral mechanism of vitamin C in *KRAS* mutant colorectal cancer that involves the Warburg metabolic disruption through downregulation of key metabolic checkpoints in *KRAS* mutant cancer cells and tumors without killing human immortalized colonocytes.

Vitamin C induces RAS detachment from the cell membrane inhibiting ERK 1/2 and PKM2 phosphorylation. As a consequence of this activity, strong downregulation of the glucose transporter (GLUT-1) and pyruvate kinase M2 (PKM2)-PTB dependent protein expression are observed causing a major blockage of the Warburg effect and therefore energetic stress.

We propose a combination of conventional chemotherapy with metabolic strategies, including vitamin C and/or other molecules targeting pivotal key players involved in the Warburg effect which may constitute a new horizon in anti-cancer therapies.

INTRODUCTION

The *KRAS* proto-oncogene encodes a ~21 kDa small GTPase, which cycles between GTP-bound active and GDP-bound inactive states. Mutated *KRAS* is reported in approximately 35%-45% of colorectal cancers and >90% of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) [1, 2]. Molecular evidences support the master role of oncogenic

KRAS disrupting the metabolic homeostasis via alteration of glucose uptake, glycolytic flux, and glutamine usage in colon and pancreatic tumors that often display very high resilience to chemotherapy [3].

Quest for new scopes and molecules capable to overcome chemotherapy resistance in tumors displaying gene mutations downstream EGFR is a top priority in oncological research worldwide.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Predictive value of vrk 1 and 2 for rectal adenocarcinoma response to neoadjuvant chemoradiation therapy: a retrospective observational cohort study

Laura del Puerto-Nevaldo¹, Juan Pablo Marin-Arango², Maria Jesus Fernandez-Aceñero^{3,4}, David Arroyo-Manzano⁵, Javier Martinez-Useros¹, Aurea Borrero-Palacios¹, Maria Rodriguez-Remirez¹, Arancha Cebrian¹, Teresa Gomez del Pulgar¹, Marlid Cruz-Ramos¹, Cristina Carames¹, Begoña Lopez-Botet² and Jesús Garcia-Foncillas^{1*}

Abstract

Background: Neoadjuvant chemoradiotherapy (NACRT) followed by surgical resection is the standard therapy for locally advanced rectal cancer. However, tumor response following NACRT varies, ranging from pathologic complete response to disease progression. We evaluated the kinases VRK1 and VRK2, which are known to play multiple roles in cellular proliferation, cell cycle regulation, and carcinogenesis, and as such are potential predictors of tumor response and may aid in identifying patients who could benefit from NACRT.

Methods: Sixty-seven pretreatment biopsies were examined for VRK1 and VRK2 expression using tissue microarrays. VRK1 and VRK2 Histoscores were combined by linear addition, resulting in a new variable designated as "composite score", and the statistical significance of this variable was assessed by univariate and multivariate logistic regression. The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test and area under the ROC curve (AUC) analysis were carried out to evaluate calibration and discrimination, respectively. A nomogram was also developed.

Results: Univariate logistic regression showed that tumor size as well as composite score were statistically significant. Both variables remained significant in the multivariate analysis, obtaining an OR for tumor size of 0.65 (95 % CI, 0.45–0.94; $p = 0.021$) and composite score of 1.24 (95 % CI, 1.07–1.48; $p = 0.005$). Hosmer-Lemeshow test showed an adequate model calibration ($p = 0.630$) and good discrimination was also achieved, AUC 0.79 (95 % CI, 0.68–0.90).

Conclusions: This study provides novel data on the role of VRK1 and VRK2 in predicting tumor response to NACRT, and we propose a model with high predictive ability which could have a substantial impact on clinical management of locally advanced rectal cancer.

Keywords: VRK1, VRK2, Rectal cancer, Chemoradiotherapy, Tumor response, Nomogram, Composite score, NACRT

* Correspondence: jesus.garciafoncillas@oncohealth.eu

¹Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz", Avenida Reyes Catolicos, 2, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Focal adhesion kinase: predictor of tumour response and risk factor for recurrence after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer

Teresa Gómez del Pulgar^{a, #}, Arancha Cebrián^{a, #, *}, María Jesús Fernández-Aceñero^{b, †}, Aurea Borrero-Palacios^a, Laura del Puerto-Nevaldo^a, Javier Martínez-Useros^a, Juan Pablo Marín-Arango^a, Cristina Caramés^a, Ricardo Vega-Bravo^b, María Rodríguez-Remírez^a, Marlid Cruz-Ramos^a, Félix Manzarbeitia^b, Jesús García-Foncillas^a

^a *Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz", Madrid, Spain*

^b *Pathology Department, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz", Madrid, Spain*

[†] *Present address: Pathology Department, Hospital Clinico San Carlos, Madrid 28040, Spain*

Received: January 20, 2016; Accepted: March 21, 2016

Abstract

Rectal cancer represents about 30% of colorectal cancers, being around 50% locally advanced at presentation. Chemoradiation (CRT) followed by total mesorectal excision is the standard of care for these locally advanced stages. However, it is not free of adverse effects and toxicity and the complete pathologic response rate is between 10% and 30%. This makes it extremely important to define factors that can predict response to this therapy. Focal adhesion kinase (FAK) expression has been correlated with worse prognosis in several tumours and its possible involvement in cancer radio- and chemosensitivity has been suggested; however, its role in rectal cancer has not been analysed yet. To analyse the association of FAK expression with tumour response to CRT in locally advanced rectal cancer. This study includes 73 patients with locally advanced rectal cancer receiving standard neoadjuvant CRT followed by total mesorectal excision. Focal adhesion kinase protein levels were immunohistochemically analysed in the pre-treatment biopsies of these patients and correlated with tumour response to CRT and patients survival. Low FAK expression was significantly correlated with local and distant recurrence ($P = 0.013$). Low FAK expression was found to be a predictive marker of tumour response to neoadjuvant therapy ($P = 0.007$) and patients whose tumours did not express FAK showed a strong association with lower disease-free survival ($P = 0.01$). Focal adhesion kinase expression predicts neoadjuvant CRT response in rectal cancer patients and it is a clinically relevant risk factor for local and distant recurrence.

Keywords: rectal cancer • chemoradiotherapy • focal adhesion kinase • predictive marker • risk factor • neoadjuvant therapy

Introduction

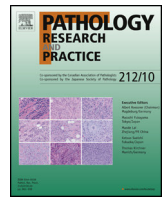
Rectal cancer represents about 30% of colorectal cancers [1], remaining a significant problem worldwide. In the majority of cases the disease is localized to the primary site with no evidence of distant spread, and in these patients surgical resection currently remains the cornerstone of treatment. Pre-operative chemoradiation (CRT) and then total mesorectal excision is currently the standard of care for locally advanced stages of rectal cancer, to reduce the probability of

recurrence and to possibly improve overall survival [2, 3]. The use of neoadjuvant CRT results in a reduction in local recurrence rates when compared to surgery alone [3, 4].

The tumour response to neoadjuvant therapy is assessed as tumour and nodal downstaging and tumour regression grade, which has been correlated with a better outcome [5, 6]. While complete response is only observed in 10–30% of cases, in the rest of the cases the residual disease varies from microscopic tumour foci to no response at all [7]. Many factors may predict tumour response to CRT [8–12] but up to now, a model that would predict clinically or pathologically complete or partial tumour response after CRT is not available.

[#]These authors have contributed equally to this work.

*Correspondence to: Dr. Arancha CEBRIÁN.
E-mail: arancha.cebrian@fjd.es



Original article

Decreased PLK1 expression denotes therapy resistance and unfavourable disease-free survival in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy



Arancha Cebrián^{a,*}, Teresa Gómez del Pulgar^{a,1}, María Jesús Fernández-Aceñero^{b,2}, Aurea Borrero-Palacios^a, Laura del Puerto-Nevado^a, Javier Martínez-Useros^a, Juan Pablo Marín-Arango^a, Cristina Caramés^a, Ricardo Vega-Bravo^b, María Rodríguez-Remírez^a, Felix Manzarbeitia^b, Jesús García-Foncillas^a

^a Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz", 28040 Madrid Spain

^b Pathology Department, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz", 28040 Madrid Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2016

Received in revised form 2 May 2016

Accepted 19 September 2016

Keywords:

Chemoradiotherapy
Polo-like kinase 1
Predictive marker
Rectal cancer
Risk factor

ABSTRACT

Aim: Polo-like kinase 1 (Plk1) plays a key role in mitotic cell division and DNA damage repair. It has been observed that either up-regulated or down-regulated Plk1 could induce mitotic defects that results in aneuploidy and tumorigenesis, probably depending on the context. Few previous reports have associated Plk1 expression with prognosis and response to radiotherapy in rectal carcinomas. The aim of this study is to investigate the prognostic impact of Plk1 expression and its role in predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer.

Methods and results: Immunohistochemical analysis of Plk1 expression was performed in the pre-treatment tumour specimens from 75 rectal cancer patients. We analysed the association between Plk1 expression and clinicopathological parameters, pathologic response and outcome. Opposed to previous reports on this issue, low expression of Plk1 was significantly associated with a high grade of differentiation ($P=0.0007$) and higher rate of distant metastasis ($P=0.014$). More importantly, decreased levels of Plk1 were associated with absence of response after neoadjuvant therapy ($P=0.049$). Moreover, low Plk1 expression emerged as an unfavourable prognostic factor for disease-free survival in the non-responder group of patients ($P=0.037$).

Conclusions: Decreased Plk1 expression was associated with poor pathologic response and worse disease-free survival in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy, suggesting Plk1 as a clinically relevant marker to predict chemoradiotherapy response and outcome.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Neoadjuvant treatment is the standard of care for locally advanced rectal adenocarcinoma. Preoperative chemoradiotherapy

(CRT) and subsequent radical resection have shown to improve outcome in these patients [1]. A complete pathologic response is only observed in approximately 10% to 30% of patients, whereas nearly 40% of patients show poor or no response to preoperative CRT [2].

The primary cytotoxic lesion induced by therapeutic radiotherapy is DNA double-strand breaks (DSBs) [3]. Current research has focused on molecular markers involved in the resistance toward anticancer therapy including key regulators for the mitotic progression and DNA damage repair pathways [4–7]. One of these factors is the serine/threonine kinase Polo-like kinase 1 (Plk1), which is a key for cell division and mitotic progression and DNA damage repair [8,9]. It is overexpressed in many types of human cancers and many of these studies have demonstrated that Plk1 overexpression correlates with tumour progression and patient outcome [10]. However, there is other evidence supporting the role of Plk1

Abbreviations: CRT, chemoradiotherapy; DSB, double-strand break; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; MRI, magnetic resonance imaging; MTA, microtubule-targeting agent; Plk1, Polo-like kinase 1; TMA, tissue microarray.

* Corresponding author at: Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital "Fundacion Jimenez Diaz" Avenida Reyes Católicos, 2– 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: arancha.cebian@fjd.es (A. Cebrián).

¹ These authors have contributed equally to this work.

² Present address: Pathology Department, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain.

MicroRNA-21 predicts response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer

Cristina Caramés¹ · Ion Cristóbal² · Víctor Moreno¹ · Laura del Puerto² · Irene Moreno¹ · María Rodríguez² · Juan P. Marín³ · Andrea V. Correa¹ · Roberto Hernández¹ · Víctor Zenzola¹ · Tatiana Hernández¹ · Ana León¹ · José I. Martín¹ · Paloma Sánchez-Fayos⁴ · Damián García-Olmo⁵ · Federico Rojo⁶ · Ajay Goel⁷ · María J. Fernandez-Aceñero⁶ · Jesús García-Foncillas^{1,2}

Accepted: 28 April 2015 / Published online: 8 May 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Purpose The treatment of choice for locally advanced rectal cancer is preoperative chemoradiotherapy. Despite half of patients do not respond and suffer unnecessary toxicities and surgery delays, there are no biomarkers to guide preoperative CRT outcome. MicroRNA-21 has been related to acquisition of 5-fluorouracil resistance; however, its potential predictive value of response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer remains unknown.

Methods Eighty-two patients diagnosed with locally advanced rectal cancer who were preoperatively treated with chemoradiotherapy were selected for this study. Moreover, microRNA-21 expression was quantified in formalin-fixed paraffin-embedded biopsies from this cohort, and the results obtained were correlated with clinical and molecular characteristics, pathological response, and outcome.

Results MicroRNA-21 was found overexpressed in 77.6 % cases, and significantly correlated with tumor grade after preoperative chemoradiotherapy ($P=0.013$) and with pathological

response ($P=0.013$). The odds ratio of having miR-21 overexpression and not getting a respond to chemoradiotherapy resulted in 9.75 CI 2.24 to 42. Sensitivity, specificity, negative predictive values, and positive predictive value were 86.6, 60, 42.8, and 92 %, respectively. Multivariate analysis confirmed the clinical significance of miR-21 determining preoperative chemoradiotherapy response.

Conclusions MicroRNA-21 expression efficiently predicts preoperative chemoradiotherapy pathological response in locally advanced rectal cancer.

Keywords miR-21 · Prognosis · Rectal cancer · Chemoradiotherapy

Introduction

Rectal carcinoma accounts for approximately 28 % of all colorectal malignancies [1, 2]. The treatment of choice for

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00384-015-2231-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ion Cristóbal
ion.cristobal@idcsalud.es

✉ Jesús García-Foncillas
jgfoncillas@gmail.com

¹ Medical Oncology Department, University Hospital “Fundación Jimenez Diaz”, Avda. Reyes Católicos-2, 28040 Madrid, Spain

² Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital “Fundación Jimenez Diaz”, Avda. Reyes Católicos-2, 28040 Madrid, Spain

³ Radiation Oncology Department, University Hospital “Fundación Jimenez Diaz”, Avda. Reyes Católicos-2, 28040 Madrid, Spain

⁴ Gastroenterology Department, University Hospital “Fundación Jimenez Diaz”, Avda. Reyes Católicos-2, 28040 Madrid, Spain

⁵ Surgery Department, University Hospital “Fundación Jimenez Diaz”, Avda. Reyes Católicos-2, 28040 Madrid, Spain

⁶ Pathology Department, University Hospital “Fundación Jimenez Diaz”, Avda. Reyes Católicos-2, 28040 Madrid, Spain

⁷ Gastrointestinal Cancer Research Laboratory, Baylor Research Institute and Sammons Cancer Center, Baylor University Medical Center, 3500 Gaston Avenue, Dallas, TX 75246, USA

OPEN

Identification of Poor-outcome Biliopancreatic Carcinoma Patients With Two-marker Signature Based on ATF6 α and p-p38 “STARD Compliant”

J. Martinez-Useros, PhD, T. Georgiev-Hristov, MD, PhD, A. Borrero-Palacios, M.J. Fernandez-Aceñero, MD, PhD, M. Rodríguez-Remírez, L. del Puerto-Nevado, PhD, A. Cebrian, PhD, M.T. Gomez del Pulgar, PhD, A. Cazorla, MD, PhD, R. Vega-Bravo, N. Perez, A. Celdran, MD, PhD, and J. Garcia-Foncillas, MD, PhD

Abstract: Biliopancreatic cancer is one of the most aggressive solid neoplasms, and incidence is rising worldwide. It is known that ATF6 α is one of the transmembrane proteins that acts crucially in endoplasmic reticulum stress response, and knockdown induces apoptosis of pancreatic cells. Apart from this, p-p38 has been previously correlated with better outcome in pancreatic cancer. Interestingly, ATF6 α knockdown pancreatic cells showed increased p-p38. The aim of this study was to evaluate the expression of these 2 proteins, p-p38 and ATF6 α , and their correlation with the outcome of biliopancreatic adenocarcinoma patients.

Samples from patients with biliopancreatic adenocarcinoma that underwent pancreaticoduodenectomy from 2007 to 2013 were used to construct a tissue microarray to evaluate p-p38 and ATF6 α proteins by immunohistochemistry.

We observed that both markers showed a tendency to impact in the time to recurrence; then a combination of these 2 proteins was analyzed. Combination of ATF6 α ^{high} and p-p38^{low} was strongly associated with a higher risk of recurrence (hazard ratio 2.918, $P = 0.013$). This 2-protein model remained significant after multivariate adjustment.

We proposed a 2-protein signature based on ATF6 α ^{high} and p-p38^{low} as a potential biomarker of risk of recurrence in resected biliopancreatic adenocarcinoma patients.

(*Medicine* 94(45):e1972)

Abbreviations: 5FU = 5-fluorouracil, ATF6 α = activating transcription factor 6 isoform α , BRCA2 = breast cancer type 2, CA19-9 = carbohydrate antigen 19-9, CA-50 = carbohydrate antigen 50, CEA = carcinoembryonic antigen, CI = confidence

Editor: Feng Yang.

Received: June 10, 2015; revised: October 5, 2015; accepted: October 10, 2015.

From the Translational Oncology Division, OncoHealth Institute, University Hospital Fundacion Jimenez Diaz (JM-U, AB-P, MR-R, L.P-N, AC, MTGP, JG-F); Hepatobiliary and Pancreatic Surgery Unit, General and Digestive Tract Surgery Department, University Hospital Fundacion Jimenez Diaz (TG-H, AC); Department of Pathology, University Hospital Clinico San Carlos (MJF-A); and Department of Pathology, University Hospital Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain (AC, RV-B, NP).

Correspondence: Javier Martínez-Useros, Translational Oncology Division, OncoHealth Institute, University Hospital Fundacion Jimenez Diaz, Av. Reyes Catolicos no 2, 28040 Madrid, Spain (e-mail: javier.museros@idcsalud.es).

This work has been carried out with the support of the RNA-Reg CONSOLIDER-Consortium (CSD2009-00080).

The authors declare no conflict of interest.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ISSN: 0025-7974

DOI: 10.1097/MD.0000000000001972

interval, DUPAN-2 = pancreatic cancer-associated antigen 2, ER = endoplasmic reticulum, FFPE = formalin-fixed paraffin-embedded tissues, GRP78 = glucose regulating protein 78, HR = hazard ratio, HuR = human antigen R, MAPK = mitogen-activated protein kinase, MUC1 = mucin 1, p-p38 = phosphorylated-p38 (cytokinin specific binding protein), Smad4 = mothers against decapentaplegic homolog 4, SPARC = secreted protein acidic and rich in cysteine, VEGF = Vascular endothelial growth factor.

INTRODUCTION

Biliopancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer death in both sexes in the USA. It is estimated that 46,420 new cases of this cancer are diagnosed in 2014—23,530 in men and 22,890 in women. The estimated death number in USA in 2014 was 39,590 cases,¹ and 227,000 deaths per year worldwide.² Furthermore, statistical analysis from 2001 to 2010 indicates that death rates are rising.¹

In this kind of cancer, survival can be improved when tumors are detected at an early stage. It has been reported that 5-year survival rate is of 50% when tumors are <2 cm³ and close to 100% for tumors <1 cm.⁴ Although these data are encouraging, biliopancreatic cancer is usually asymptomatic, and disease only becomes apparent after the tumor invades surrounding tissues or metastasizes to distant organs.⁵

Up to date, the unique prognostic biomarker approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for resectable biliopancreatic cancer is the preoperative levels of carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9).⁶ This marker shows a relatively high sensitivity and specificity for this cancer,⁷ which is superior compared with other markers, such as carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 50 (CA-50), and pancreatic cancer-associated antigen 2.^{8,9} However, the applicability of this marker is not obvious since other clinical events such as biliary obstruction can increase CA19-9 serum levels,¹⁰ and up to 10% of the population cannot synthesize CA19-9.¹¹ Nevertheless, CA19-9 is considered the best serum marker for biliopancreatic cancer.¹²

To date, surgical resection remains the best option to manage with biliopancreatic cancer in surgically amenable tumors, and survival can be predicted based on pathological characteristics like tumor size, grade of differentiation, and lymph node status.¹³ However, after surgery, there is a lack of validated prognostic or predictive markers to be used in the patient management.¹⁴ In this sense, there have been several reports on some prognostic molecular biomarkers, such as mothers against decapentaplegic homolog 4 (Smad4) or mucin 1 (MUC1), and also predictive markers including secreted