



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS
DOCTORAL

TIIFICACIÓ MOLECULAR
DE TUMORS NEUROENDOCRINS
GASTROENTEROPANCREÀTICS.

DESENVOLUPAMENT DE
NOVES TERÀPIES I BÚSQUEDA
DE NOUS BIOMARCADORS

Jaume Capdevila i Castellón

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL

TIPIFICACIÓ MOLECULAR DE TUMORS NEUROENDOCRINS GASTROENTEROPANCREÀTICS. DESENVOLUPAMENT DE NOVES TERÀPIES I BÚSQUEDA DE NOUS BIOMARCADORS

Tesi per a optar al grau de doctor
Jaume Capdevila i Castellón

Director de la Tesis

Dr. Josep M^a Tabernero Caturla

Tutor de Tesis

Jordi Giralt Lopez de Sagredo

Programa de doctorat de Medicina
Facultat de Medicina
Barcelona, setembre de 2016

AGRAÏMENTS

Als meus pares per instaurar-me uns valors immillorables i per deixar-me una llibertat absoluta per a triar un camí diferencial en la meva família.

Al meu germà Ricard per ser únic, irrepetible i per ser un mirall per a mi en tot allò que ell ha aconseguit i jo no.

A les meves filles Judit i Laia. Tot i que ara no ho entendran, quan creixeran comprendran que són la meva raó de ser.

A la Dra. Anna Balil, per despertar-me l'interès i ensenyar-me com ha de ser un metge que es dediqui a la oncologia.

Als Santpauencs.

Al Dr. Josep Tabernero per saber veure en mi l'oncòleg que vull arribar a ser, guiar-me i oferir-me les possibilitats per a aconseguir-ho i al Dr. José Baselga per acollir-me en el millor centre oncològic del país.

Al Dr. Jordi Giralt per tutoritzar la meu projecte de tesi doctoral

Al Dr. Ramon Salazar per introduir-me en el món dels tumors neuroendocrins i donar-me suport continu

Al Dr. Joan Borràs per facilitar-me l'adaptació i aconsellar-me en els meus primers anys de la oncologia.

Als Drs. Josep Àngel Bosch i Albert Selva per guiar-me en el procés del doctorat.

Als Drs. Xavier García del Muro i Víctor Vargas que per amistat accepten papers secundaris i se'ls mereixen principals.

A l'Ana Vivancos per ajudar-me a comprendre i estimular-me en la oncologia del futur.

A l'Hèctor García-Palmer per a ajudar-me a anar més enllà del que representa aquest treball i per fer fàcil el que sembla molt difícil.

A l'Stefania Landolfi per acompanyar-me en la creuada dels tumors neuroendocrins.

Als meus companys i amics de la unitat, del servei i de l'hospital, amb qui acabes compartint molt més que la feina.

I als meus companys i amics d'altres hospitals, sense els quals aquesta tesi no hagués estat possible, i on el treball en equip agafa una altra dimensió.

ÍNDEX

1. Introducció.....	10
2. Epidemiologia de les neoplasies neuroendocrines.....	15
3. Diagnòstic anatomopatològic i sistemes de classificació.....	20
3.1 Característiques anatomopatològiques de les NENs.....	21
3.2 Sistemes de classificació.....	27
4. Presentació clínica, diagnòstic i pronòstic dels GEP-NENs.....	32
4.1 Presentació clínica.....	33
4.2 Diagnòstic.....	37
4.2.1 Diagnòstic bioquímic.....	37
4.2.2 Diagnòstic per a imatge.....	41
5. Biologia molecular de les neoplasies neuroendocrines.....	46
6. Tractament sistèmic de les neoplàsies neuroendocrines avançades.....	57
6.1 Tractament hormonal i biològic.....	58
6.2 Tractament quimioteràpic.....	61
6.3 Tractament amb teràpies dirigides.....	67
7. Caracterització genòmica en oncologia.....	72
8. Justificació.....	77
9. Hipòtesis.....	80
9.1 Principals.....	81
9.2 Secundaries.....	81
10. Objectius.....	82
10.1 Primaris.....	83
10.1 Secundaris.....	83

11. Mètodes.....	84
11.1 Tipus d'estudi.....	85
11.2 Selecció de la mostra.....	85
11.3 Anàlisi molecular genòmic de les mostres.....	85
11.4 Anàlisi de metil·lació de l'ADN mitjançant tecnologia microarray.....	87
11.5 Anàlisi de la inestabilitat de microsatèl·lits.....	89
11.6 Experiment amb PDX derivat de pacient amb CNE colònic.....	89
12. Resultats.....	91
12.1 Resultats de l'estudi genòmic.....	92
12.2 Resultats de l'anàlisi de metil·lació de l'ADN mitjançant tecnologia microarray.....	95
12.3 Resultats de l'anàlisi de la inestabilitat de microsatèl·lits.....	100
12.4 Resultat de l'experiment amb PDX derivat de pacient amb CNE colònic.....	101
13. Discussió.....	103
14. Conclusions.....	110
15. Bibliografia.....	112

LLISTAT D'ABREVIATURES

5-FU: 5-fluorouracil

5-HIAA: àcid 5-hidroxiindolacètic urinari

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ASH1: absent, small, or homeotic like

CDX-2: cabal-type homeobox protein 2

CGA: camps de gran augment

CK7: Cytokeratin 7

c-KIT: receptor de cèl·lules mare

CNEs: carcinomes neuroendocrins

DOX: doxorubicina

DTIC: dacarbacina

EGFR: epidermal growth factor receptor

ENETS: European Neuroendocrine Tumor Society

FGF: fibroblast growth factor

GEP-NENs: gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms

GRS: gammagrafia de receptors de somatostatina

IFN: interferó alfa 2b

IGFR1: receptor del factor de creixement de la insulina

ISL1: insulin gene enhancer protein-1

MEN: neoplàsia endocrina múltiple

MGMT: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase

MIB1: mind bomb E3 ubiquitin protein ligase 1

mTOR: mammalian target of rapamycin

N-CAM: neural cell adhesion molecule

NENs: neoplàsies neuroendocrines

NF-1: neurofibromatosi tipus 1

OMS: Organització Mundial de la Salut

PET: tomografia amb emissió de positrons

PDGFR: platelet derived growth factor receptor

PDX: patient derived xenograft

PDX-1: Pancreatic and duodenal homeobox 1

PI3KCA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PIP2: fosforilació de fosfatidilinositol 4,5, -difosfat

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5, -trisfosfat

PTEN: phosphatase and tensin homolog

REGETNE: registre espanyol del grup espanyol de tumors endocrins

RET: rearranged during transfection

RMN: ressonància magnètica nuclear

SEER: surveillance, epidemiology and end results program

SSAs: anàlegs de la somatostatina

SST: somatostatina

SSTR: receptors de la somatostatina

STZ: estreptozotocina

SUV: standarized uptake value

TC: tomografia computeritzada

TMA: temozolamida

TNEs: tumors neuroendocrins

TNM: tumor, lymph node, metastasis

TSC: esclerosi tuberosa

TTF-1: thyroid transcription factor 1

VEGF-R: vascular endothelial growth factor receptor

VHL: von Hippel-Lindau

1 Introducció

1. INTRODUCCIÓ

Les neoplàsies neuroendocrines representen el 2% dels tumors gastrointestinals i constitueixen un conjunt de malalties neoplàsiques d'una gran heterogeneïtat clínica, bioquímica i de comportament biològic. Comparteixen una sèrie de característiques histopatològiques comuns si bé s'originen en cèl·lules neuroendocrines d'àmplia distribució anatòmica incloent cèl·lules de la cresta neural (ganglioneuroma, neuroblastoma, paraganglioma), glàndules endocrines (adenoma d'hipòfisi, feocromocitoma), illots endocrins pancreàtics, tiroides, cutànies, i cèl·lules del sistema endocrí difús (gastrointestinal, broncopulmonar, tímica, urogenital,...). La primera definició com tumors carcinoïdes per Siegfried Oberndorfer el 1907 va marcar la història d'un grup de neoplàsies que histològicament eren similars al càncer conegut en altres localitzacions del cos, però tenien un comportament clínic peculiar, en ocasions indolent (carcinoide = "carcinoma-like"). Recentment s'ha adoptat el terme neoplàsies neuroendocrines gastro-entèric-pancreàtiques (GEP-NENs de l'abreviatura en anglès "gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms"), o gastrointestinals i pancreàtics, que és clarament més apropiada. L'espectre de presentació clínica dels GEP-NENs és ampli i variat¹. El seu curs clínic és també molt heterogeni, i ve donat tant per la localització del tumor primari com pel seu heterogeni comportament biològic. Aquest comportament pot anar des d'indolent i cursar sense símptomes, com és el cas dels tumors diagnosticats de manera incidental en procediments quirúrgics o autòpsies practicades per altres causes, o cursar amb símptomes derivats de l'efecte mecànic del propi tumor o pel potencial d'alguns d'ells de sintetitzar i excretar diferents hormones

polipeptídiques al torrent circulatori que causen síndromes clíniques específiques, i en aquest cas es denominen tumors neuroendocrins funcionals. Tot i això, els símptomes de presentació més freqüentment observats són aquells derivats de l'efecte mecànic per l'ocupació d'espai com el dolor abdominal o l'obstrucció, invaginació o isquèmia intestinal que el tumor primari o la fibrosi mesentèrica que aquest indueix sovint quan es localitza a l'intestí prim. Aquests símptomes (dolor abdominal, nàusees, vòmits, ..) poden ser de caràcter intermitent i precedir diversos anys al diagnòstic. Les síndromes clíniques hormonals, per contra, sovint faciliten i avancen el diagnòstic. Aquests tumors, d'altra banda, poden presentar-se de manera aïllada o com a part d'una síndrome genètica hereditària (neoplàsia endocrina múltiple tipus 1 i 2, neurofibromatosis tipus 1, malaltia de Von Hippel-Lindau), de manera que la història familiar i l'existència d'altres tumors endocrins en el mateix individu ha de ser sempre acuradament avaluada.

El diagnòstic dels GEP-NENs està basat en la presentació clínica i expressió bioquímica de la malaltia (concentració plasmàtica i/o urinària de diverses amines biògenes i pèptids vasoactius), i en l'avaluació radiològica i histopatològica del tumor^{1,2}. Els tests bioquímics són útils tant per a confirmar el diagnòstic i orientar la localització del tumor primari, com per monitoritzar la resposta al tractament i durant el seguiment d'aquests pacients. Existeixen marcadors bioquímics generals i específics de cada síndrome hormonal. Els millors marcadors generals són la cromogranina A i el polipèptid pancreàtic. La cromogranina A és el marcador més sensible, trobant-se elevat en el 60-80% dels GEP-NENs, i té un valor pronòstic y predictiu de resposta als nous

tractaments quan la davallada és significativa després de l'inici de la nova teràpia. La concentració de l'àcid 5-hidroxi-indol-acètic en orina de 24 hores ha de ser determinada en tot pacient amb sospita de síndrome carcinoide. La realització d'altres tests bioquímics vindrà determinada per la clínica del pacient (insulina, gastrina, somatostatina, glucagó, pèptid intestinal vasoactiu,...). Una avaluació clínica i bioquímica adequades seran de gran utilitat a l'hora d'orientar l'estudi radiològic que determinarà tant la localització del tumor primari com el seu grau d'extensió. Els tumors originats al tòrax, estómac, duodè o còlon se solen detectar sense dificultat mitjançant endoscòpia o tomografia computeritzada (TC). No passa el mateix amb els tumors primaris jejú-ileals, els quals cursen amb freqüència amb símptomes abdominals inespecífics i proves radiològiques normals. Els tumors d'origen pancreàtic no funcionals en general es diagnostiquen en estadis avançats de la malaltia. Per contra, els tumors pancreàtics productors d'hormones solen ser diagnosticats en estadis precoços, quan la malaltia és potencialment operable, en aquest cas és imprescindible la seva localització precisa mitjançant diferents tècniques d'imatge com la TC, la ressonància magnètica nuclear (RMN), l'ecografia endoscòpica o la gammagrafia de receptors de la somatostatina^{2, 3}. Més del 80% dels GEP-NENs expressen receptors de somatostatina (a excepció del insulinoma que l'expressa només en el 50% dels casos), la qual cosa converteix a la gammagrafia de receptors de somatostatina en l'exploració radiològica probablement de més utilitat tant diagnòstica com d'orientació terapèutica. Permet no només localitzar el tumor primari, sinó també identificar aquells pacients amb malaltia no operable o metastàtica subsidiaris de tractaments amb anàlegs de somatostatina lligats o no a radiofàrmacs. Més

recentment s'han desenvolupat nous traçadors amb precursors d'amines per a la realització de tomografia amb emissió de positrons (PET), com el 5-hidroxi-triptòfan-PET, o Ga-DOTA-PET que proporcionen una sensibilitat diagnòstica superior respecte a la TC o a la gammagrafia de receptors de somatostatina més clàssicament utilitzada, l'octreoscan®. Finalment, el diagnòstic de confirmació vindrà determinat per l'avaluació histopatològica del tumor⁴.

2

**Epidemiologia
de les neoplasies
neuroendocrines**

2. EPIDEMIOLOGIA DE LES NEOPLASIES NEUROENDOCRINES

Les neoplàsies neuroendocrines (NENs) són tumors poc freqüents (2.5-5 casos nous / 100.000 / any), encara que la seva incidència no ha parat de créixer en els últims anys (figura 1). Això es creu que és parcialment a causa de la millora de les tècniques diagnòstiques i possiblement també a l'augment en el coneixement d'aquesta malaltia per part dels clínics involucrats en el seu diagnòstic i tractament. A més, la prevalença d'aquests tumors és relativament alta a causa de la seva llarga supervivència en comparació amb altres tumors de comportament biològic més agressiu (carcinomes). De fet, les GEP-NENs són el segon grup de tumors en estadis avançats de major prevalença derivats del tracte digestiu després del carcinoma colorectal (figura 2).

Figura 1.

Segons la base de dades de la SEER, en els últims 30 anys la incidència de les neoplàsies neuroendocrines s'ha multiplicat per 5

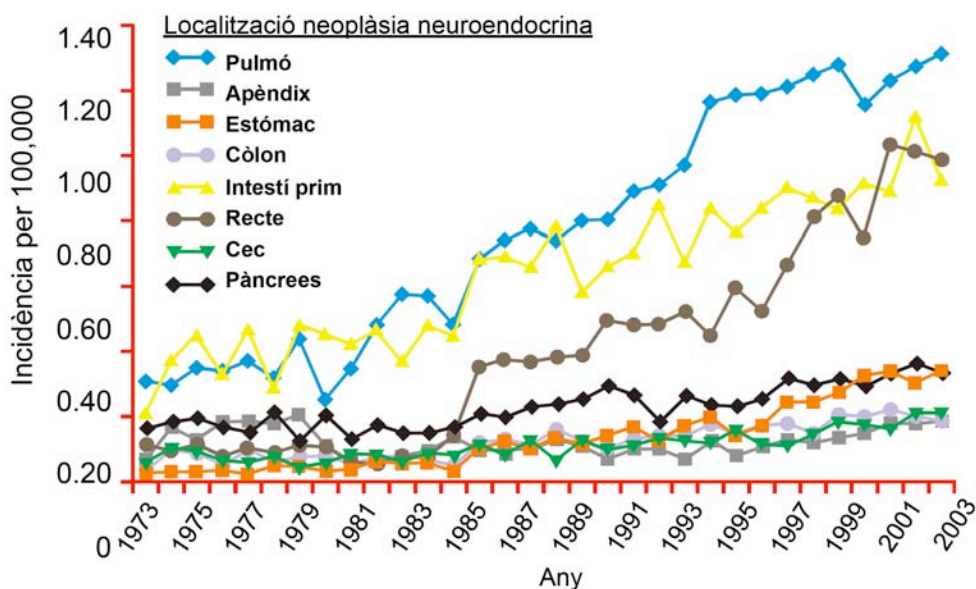
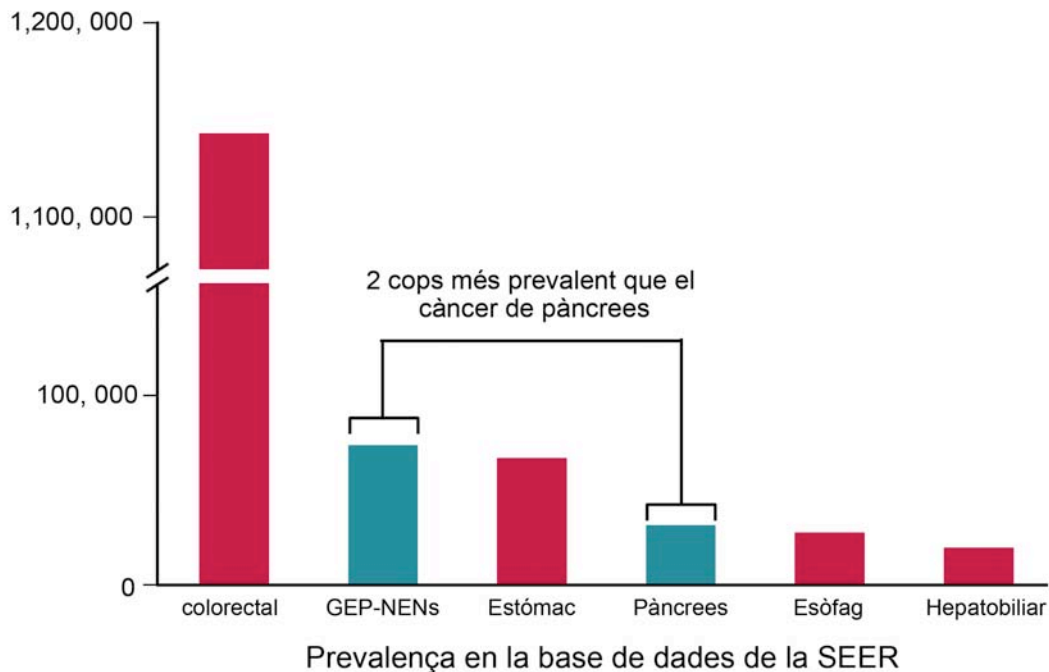


Figura 2.



Tot i que les NENs poden originar-se en qualsevol òrgan de l'anatomia, la majoria són d'origen gastrointestinal o pancreàtic (~ 65%) seguits en freqüència pels de l'arbre bronquiopulmonar (~ 25%). Dins dels tumors d'origen digestiu, les localitzacions més comuns són el pàncrees (30-40%), l'intestí prim (15-20%) i recte (5-15%). Altres localitzacions molt menys freqüents inclouen el tracte genitourinari o l'àrea otorrinolaringològica, entre d'altres. Aquesta distribució és molt variable, no obstant, en funció de la raça i de l'àrea geogràfica. Aproximadament un 25% d'aquests tumors són funcionants, és a dir, produeixen diferents hormones que donen lloc a síndromes clíniques molt característics (p.ex. síndrome carcinoide causat per serotonina, síndrome de Zollinger-Ellison causat per gastrina, etc ..).

Les NENs en general són diagnosticades en gent més jove que els carcinomes, amb una edat mitjana al diagnòstic entorn dels 60 anys. La distribució per sexes és similar, amb discretes variacions segons l'àrea geogràfica (52% de dones en el registre SEER americà, el 54% d'homes en el registre RGETNE espanyol).

La gran majoria les NENs són esporàdiques (> 95%), encara que també succeeixen en el context de síndromes hereditaris familiars com les síndromes de neoplàsia endocrina múltiple MEN 1 o MEN 2, la síndrome de von Hippel-Lindau (VHL), l'Esclerosi tuberosa (TSC) o la Neurofibromatosi tipus 1 (NF-1). La identificació d'alguns gens implicats en aquestes síndromes familiars ha contribuït a aclarir parcialment alguns dels mecanismes involucrats en la patogènesi d'aquests tumors. MEN1 és una síndrome autosòmic dominant caracteritzat fonamentalment pel desenvolupament d'adenomes de paratiroides, adenomes pituïtaris i GEP-NENs, que resulta de mutacions inactivants en línia germinal del gen MEN 1, localitzat en el cromosoma 11q13. El proto-oncogen RET és el responsable de la síndrome MEN2, caracteritzada per l'associació de carcinomes medul·lars de tiroides, feocromocitomes i hiperplàsia paratiroidal. Finalment, la malaltia de von-Hippel Lindau és una altra síndrome autosòmica dominant en el qual, a més d'existir un augment d'incidència de carcinomes renals i hemangioblastomes, s'associa a un major risc de feocromocitomes i NENs pancreàtiques. El gen VHL responsable, localitzat en el cromosoma 3p25, és un gen supressor de tumors que regula la proliferació cel·lular induïda per la hipòxia i l'angiogènesi.

L'evolució de les NENs és molt variable, depenent fonamentalment del grau d'extensió de la malaltia (estadi) i d'algunes característiques patològiques del tumor com és el grau de diferenciació o l'índex proliferatiu (Ki-67). Globalment el pronòstic varia també de manera notable segons l'origen del tumor primari, si bé és substancialment millor que per a altres neoplàsies de similar origen anatòmic. Així, les dades publicades més recentment del registre americà (SEER, 1973-2007), amb més de 50.000 casos registrats, indiquen taxes de supervivència als 5 anys per tumors originats en recte, apèndix, intestí prim, estómac o còlon el 89 %, 81%, 68%, 64% i 55%, respectivament. Les pitjors taxes de supervivència van ser observades en tumors d'origen pancreàtic, amb una supervivència a 5 anys del 38%. Aquestes xifres amb prou feines han millorat al llarg de l'última dècada malgrat els inqüestionables avenços diagnòstics i terapèutics experimentats, la qual cosa podria ser atribuït, almenys parcialment, al fet que aquests avenços probablement no estiguin arribant a una gran majoria dels pacients , que continuen amb freqüència no sent derivats a centres de referència amb experiència en el maneig d'aquesta complexa malaltia.

3
**Diagnòstic
anatomopatològic
i sistemes
de classificació**

3. DIAGNÒSTIC ANATOMOPATOLÒGIC I SISTEMES DE CLASSIFICACIÓ

3.1 Característiques anatomopatològiques de les NENs

Les NENs es classifiquen en funció del grau histològic. Existeixen bàsicament dos grans grups: els tumors neuroendocrins (TNEs) ben diferenciats i els carcinomes neuroendocrins (CNEs) pobrament diferenciats.

Els TNEs ben diferenciats tenen trets comuns en les seves diferents localitzacions. Des d'un punt de vista microscòpic, aquests tumors tenen una morfologia molt característica i estan constituïts per cèl·lules monòtones, amb nuclis monomorfs i cromatina dispersa. Les cèl·lules es disposen en nius, cordons o trabècules, separats per un estroma fibrovascular. Hi pot haver fibrosi i calcificació. Alguns tumors tenen estroma hialinitzat. Des d'un punt de vista immunohistoquímic, les cèl·lules tumorals solen ser positives per cromogranina A i sinaptofisina. És important valorar la capacitat proliferativa amb la determinació del Ki-67 i del número de mitosis (figures 3,4). Per contra, els carcinomes neuroendocrins pobrament diferenciats de diferents localitzacions són similars als que es troben en el tracte respiratori i el pulmó. En aquests casos, la imatge microscòpica correspon a un TNE de cèl·lules petites o grans. Les cèl·lules tumorals tenen mida variable i mostren un nucli oval hiper Cromàtic. Es disposen en grans grups, encara que en ocasions adopten un vague patró organoide. Les cèl·lules mostren marcada atípia citològica, elevat índex mitòtic, cèl·lules apoptòtiques i necrosi. Una elevada proporció dels grups cel·lulars mostra necrosi «bruta» en la seva zona central.

Alguns nius poden mostrar arquitectura en rosetes. Generalment, hi ha abundants imatges d'invasió vascular i limfàtica (Figura 5).

Figura 3: Imatge de tumor neuroendocrí ben diferenciat, grau 1, amb Ki-67 <2%

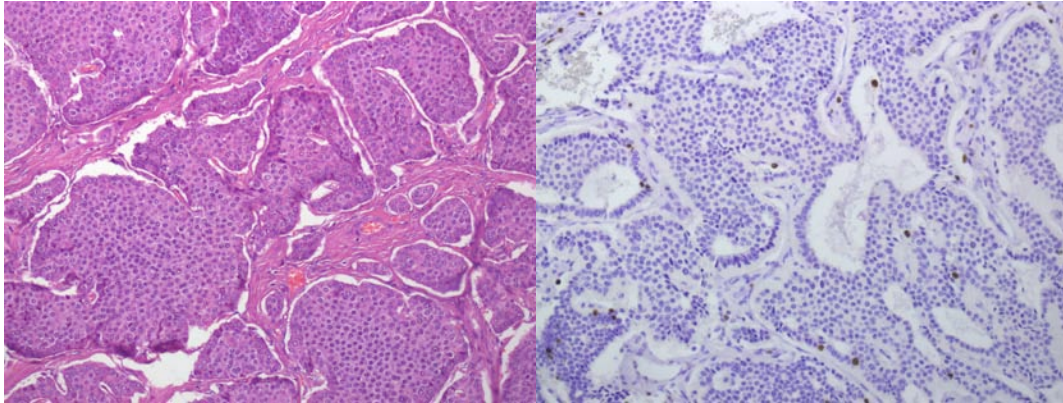


Figura 4: Imatge de tumor neuroendocrí ben diferenciat, grau 2, amb Ki-67 2-20%

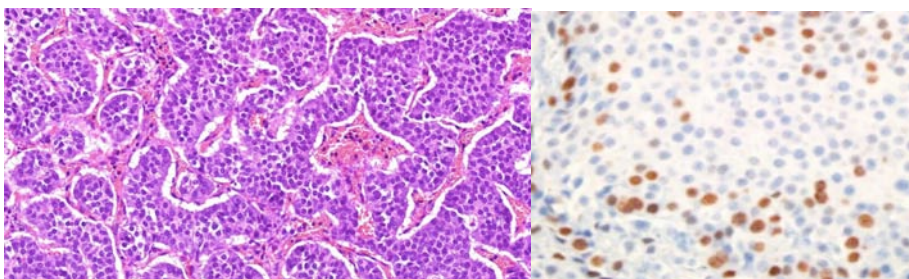
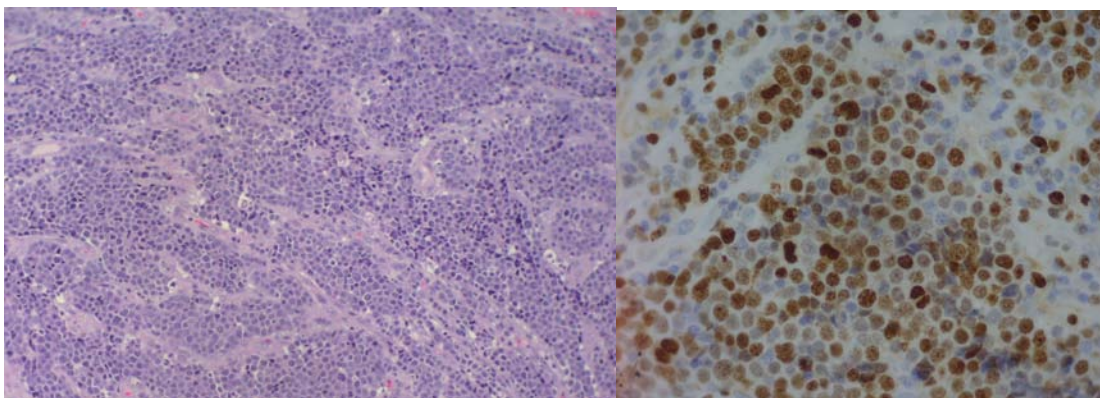


Figura 5: Imatge de carcinoma neuroendocrí pobrament diferenciat, grau 3, amb Ki-67>20%



La classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) de 2010 pràcticament obliga a la utilització de tres tipus de marcadors per a la tipificació de les NENs. Aquells que són aconsellables per verificar la naturalesa neuroendocrina d'un tumor (cromogranina A i sinaptofisina) i el marcador de proliferació Ki-67, imprescindible per a una adequada valoració del grau histològic del tumor. La valoració de l'índex de proliferació és complementària a l'avaluació de Ki-67. La demostració de la diferenciació neuroendocrina mitjançant l'ús de marcadors immunohistoquímics és molt important en el diagnòstic de les NENs. Els marcadors recomanats són la cromogranina A i la sinaptofisina, i haurien de ser aplicats en la gran majoria de les NENs, incloses les biòpsies de tumors metastàtics. Altres marcadors (cromogranina B, CD [clúster de diferenciació]-56 / N-CAM [neural cell adhesion molecule], CD57 / leu7 [Leucocyte antigen 7]) no són recomanables pels seus baixos nivells de sensibilitat o especificitat, encara que són opcionals en casos en què algun dels marcadors principals (cromogranina A o sinaptofisina) siguin negatius i hi

hagi un dubte raonable de la naturalesa neuroendocrina del tumor per la seva aparença microscòpica. Aquests marcadors s'expressen universalment en les NENs de diverses localitzacions i també en els feocromocitomes i paragangliomes.

La quantificació amb Ki-67 és un paràmetre essencial en la valoració d'una NENs. La valoració del percentatge de cèl·lules que expressen Ki-67 proporciona un mètode de quantificació de la taxa de proliferació precís i fiable sempre que s'apliqui amb una metodologia acurada, que complementa o substitueix la quantificació de l'índex mitòtic. La valoració de Ki-67 s'ha de fer amb la major precisió possible en les àrees de major activitat proliferativa (hotspot). Aquest és un punt important, ja que la selecció d'aquestes zones de major proliferació és la font més important de variació entre diferents observadors. És important prestar especial atenció a evitar la valoració de cèl·lules positives no neoplàsiques (limfòcits, elements estromals) que poden alterar la quantificació de la proliferació cel·lular. Hi ha diversos mètodes de quantificació de Ki-67. El més simple és l'estimació sense quantificació de cèl·lules individuals (eyeballed, «a ull»), però, en general, es considera un mètode altament subjectiu i imprecís. També s'han proposat sistemes automatitzats, que no estan exempts de problemes, ja que poden quantificar elements no neoplàsics o hemosiderina. Aquests sistemes no resolen el problema de la selecció del camp per quantificar. A més, no estan sempre accessibles a la pràctica clínica i solen implicar un pressupost elevat. El mètode més efectiu és la quantificació cèl·lula a cèl·lula de 2.000 cèl·lules en àrees de màxima immunotinció. Tot i que aquesta valoració es pot realitzar al

microscopi, també pot fer-se sobre una pantalla d'ordinador o en una impressió de la imatge capturada. És un mètode altament reproducible i ràpid (s'estima en 6 minuts el temps necessari).

Les tincions amb hormones peptídiques (insulina, glucagó, somatostatina, gastrina) només s'han d'utilitzar en casos especials, com en neoplàsia endocrina múltiple (MEN) -1 amb múltiples tumors pancreàtics en els quals cal demostrar la funcionalitat d'un tumor. A la resta de NENs, la funcionalitat es defineix per la simptomatologia i la serologia.

L'ús de marcadors immunohistoquímics tissulars és de molt interès en el cas de NENs que es presenten com càncers d'origen desconegut, sense que hi hagi una evidència concloent del seu origen primari. En aquesta situació, és recomanable utilitzar panells d'anticossos. S'ha suggerit que el panell de PDX-1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1), CDX-2 (caval-type homeobox protein 2), TTF-1 (thyroid transcription factor 1) i CK7 (Cytokeratin 7) pot permetre distingir entre orígens gastrointestinal, pancreàtic i broncopulmonar en un nombre significatiu de casos. Cal pensar en un origen pulmonar quan la NEN expressa TTF1, CK7 o ASH1 (absent, small, or homeotic like), encara que algunes NENs gastrointestinals poden mostrar positivitat per algun d'aquests marcadors. L'expressió de PDX-1 i CDX2 pot orientar cap a un origen pancreàtic i intestinal, encara que l'expressió de CDX2 pot observar-se en algunes NENs pulmonars. D'altra banda, l'expressió de PDX-1 i ISL1 (insulin gene enhancer protein-1) afavoreix un origen pancreàtic, però no ho exclou si aquests marcadors són negatius. Un altre marcador d'interès és la cadherina

17, que s'ha suggerit com més específica d'origen gastrointestinal que CDX2. Algunes NENs colòrectals són negatives per a tots els marcadors i existeix una clara manca de biomarcadors tant per al diagnòstic precís com per a un valor pronòstic i predictiu de resposta als tractaments.

Existeix un interès creixent en identificar marcadors pronòstics en NENs especialment per la peculiar forma de comportament d'aquests tumors. D'altra banda, ateses les perspectives d'utilització de fàrmacs contra dianes específiques, hi ha expectatives sobre el possible futur ús de marcadors predictius de resposta. CD117 és un marcador de mal pronòstic associat a invasió vascular i la positivitats no s'associa a mutacions activadores en el gen c-kit. En tumors pancreàtics altres marcadors d'agressivitat són CK19, ciclooxigenasa-2, p27 i CD99. Els marcadors associats a resposta terapèutica inclouen subtipus de receptors de somatostatina, MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase), VEGF-R (vascular endotelial growth factor receptor), PDGFR (platelet derived growth factor receptor) i membres de la via mTOR (mammalian target of rapamycin). No obstant això, la relació entre immunotinció i resposta terapèutica està en procés de validació. El valor predictiu de resposta als inhibidors de mTOR de les alteracions moleculars en PI3KCA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) / PTEN (phosphatase and tensin homolog) així com dels nivells basals i evolutius de p-Akt haurà de ser validat en el futur. D'altra banda, s'ha observat pèrdua de la seva expressió de MGMT en un 50% dels TNE pancreàtics, sent excepcional en els intestinals. S'ha suggerit que la disminució de MGMT s'associa a una major sensibilitat al tractament amb temozolamida.

3.2 Sistemes de classificació

La classificació de les NENs ha variat molt en els últims anys. La seva complexitat i heterogeneïtat ha estat reflectida en les diverses classificacions que s'han succeït al llarg dels anys, des de la primera designació com tumors «carcinoides» per Siegfried Oberndorfer (1907), passant per la classificació de Williams i Sandler (1963) basada en l'origen embriològic i la situació anatòmica de l'intestí anterior, mig i posterior, fins arribar a les propostes de classificació sorgides del grup de Capella, Heitz i Solcia en els anys noranta i que van ser la base per a la classificació de l'OMS en els anys 2000 i 2004, respectivament.

La necessitat d'unes pautes estandarditzades en el maneig dels pacients amb NENs va portar a l'European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) a publicar unes guies per al diagnòstic i tractament d'aquests tumors. En elles es van proposar classificacions TNM (tumor, lymph node, metastasis, staging system) de les NENs específiques per a cada territori o òrgan, que difereixen discretament en algunes d'aquestes localitzacions de la classificació TNM posteriorment proposada per l'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Així mateix, la ENETS va proposar un sistema de gradació estandarditzat basat en l'índex proliferatiu Ki-67 o en l'índex mitòtic que classifica els TNE en tres graus (taula 1). Així, en tota biòpsia en la qual es reconegui una morfologia amb característiques de NEN, i un cop demostrada la naturalesa neuroendocrina mitjançant immunotinció amb cromogranina A i/o sinaptofisina, s'ha d'establir l'activitat proliferativa, bé comptant mitosi en 40 camps de gran augment (CGA) i seleccionant 10 CGA amb la major activitat (mitosi per 10CGA) o, preferiblement, determinant l'índex de proliferació Ki-67 (MIB1: mind

bomb E3 ubiquitin protein ligase 1) de 2.000 cèl·lules en àrees de màxima immunotinció (és a dir, comptant 20 grups de 100 cèl·lules). Aquest sistema de gradació ha estat incorporat en l'última classificació de l'OMS de 2010 actualment vigent (taula 2).

En resum, la classificació de l'OMS de 2010 classifica les NENs en les següents categories:

- Tumors neuroendocrins ben diferenciats

Des d'un punt de vista microscòpic, aquests tumors tenen una morfologia molt característica i estan constituïts per cèl·lules monòtones, amb nuclis monomorfs i cromatina dispersa, disposades en nius, cordons o trabècules. Solen ser positius per cromogranina A i sinaptofisina. Aquests tumors poden ser de grau 1 (TNE G1) quan tenen un percentatge de cèl·lules que expressen el marcador de proliferació Ki-67 en menys del 2% o un índex mitòtic $<2 \times 10$ CGA. Es classifiquen en grau 2 (TNE G2) quan el percentatge de cèl·lules que expressen el marcador Ki-67 oscil·la entre el 3-20% o mostren un índex mitòtic que varia entre $2-20 \times 10$ CGA. És important esmentar que, si els índexs de mitosi i de proliferació Ki-67 són discordants, s'ha de seleccionar el de major grau. Els tumors pulmonars d'aquest grup serien els tumors carcinoides (G1) i els tumors carcinoides atípics (G2).

- Carcinomes neuroendocrins pobrament diferenciats

Aquest és un grup heterogeni que inclou diversos tipus de tumors. D'una banda, inclou TNE molt similars als de baix grau (G1 o G2), però que mostren percentatges de positivitat per Ki-67 o índexs mitòtics superiors ($\text{Ki-67} > 20\%$ o

índex mitòtic > 20 x 10 CGA). Els tumors solen expressar cromogranina A i sinaptofisina. D'altra banda, inclou també TNE que presenten la morfologia dels carcinomes neuroendocrins de cèl·lula petita o de cèl·lula gran de pulmó. Aquests tumors solen tenir índexs de Ki-67 superiors al 20% i índexs mitòtics de > 20 x 10 CGA. En aquests casos, la imatge microscòpica correspon a un TNE de cèl·lules petites o grans. Les tècniques immunohistoquímiques solen demostrar positivitat per sinaptofisina, cromogranina i queratines de baix pes molecular.

Convé ressaltar que existeix certa controvèrsia pel que fa a les lesions que s'engloben en aquest apartat. A la classificació actual, aquesta categoria inclou tant els TNE amb morfologia ben diferenciada que tenen criteris de proliferació (mitosi i Ki-67) en el rang G3, com els carcinomes neuroendocrins de cèl·lula gran i petita. Hi ha autors que consideren que aquests dos tipus tumorals tenen biologies diferents. En aquest sentit els estudis moleculars han demostrat que ambdós tipus tumorals tenen un perfil totalment diferent. També s'ha vist que en ocasions, mentre que un TNE G1 i G2 pot evolucionar a un TNE G3, rarament ho fa a un carcinoma neuroendocrí de cèl·lula petita o de cèl·lula gran. No obstant això, val la pena esmentar que, en algunes sèries, els tumors amb mitosi en el rang de G2 (<20/10CGA), però índex de Ki-67 en el rang de G3 (> 20%), tenen un pronòstic millor que els carcinomes neuroendocrins G3 amb morfologia de carcinoma neuroendocrí pobrament diferenciat o concordança de mitosi i Ki-67 en el rang de G3.

- Carcinoma mixt adenoneuroendocrí

Aquest és un tumor en el qual el component neuroendocrí, generalment d'alt grau, coexisteix amb un component epitelial maligne, de tipus carcinomatós. Existeixen evidències que tots dos components tenen un origen clonal i que, previsiblement, el component neuroendocrí s'origina del tumor epitelial preexistent.

- Lesiones hiperplàsiques i preneoplàsiques

Aquesta categoria fa referència a les lesions hiperplàsiques neuroendocrines que freqüentment hi ha al pàncrees o el tracte gastrointestinal i que són la lesió precursora dels TNE.

Taula 1. Gradació de les neoplàsies neuroendocrines gastroenteropancreàtiques proposada per la ENETS.

Grau	Número de mitosis/10 CGA	Índex Ki 67 (%)
G1	1	≤ 2 %
G2	2-20	3-20 %
G3	>20	> 20 %

CGA: camp de gran augment (1CGA = 2 mm²);

Ki-67 (anticòs MIB-1), % de 2.000 cèl·lules en àrees de màxima tinció nuclear.

*S'inclouen com a G3 tots aquells tumors neuroendocrins morfològicament ben diferenciats però amb índex Ki-67 > 20%.

Taula 2. Classificació de la Organització Mundial de la Salut (OMS) de 2010 de les neoplàsies neuroendocrines gastroenteropancreàtiques.

Classificació de l'OMS 2010

1. TNE ben diferenciats *

- TNE G1: Ki-67 \leq 2% o índex mitòtic $< 2 \times 10$ CGA
- TNE G2: Ki-67 3-20% o índex mitòtic 2-20 $\times 10$ CGA

2. CNE pobrament diferenciats *

- CNE G3 de cèl·lula gran o petita (Ki-67 $>$ 20% o índex mitòtic $> 20 \times 10$ CGA)

3. Carcinoma mixt adenoneuroendocrí

4. Lesions hiperplàsiques i preneoplàsiques

CNE: carcinomes neuroendocrins; TNE: tumors neuroendocrins.

* En cas de discrepància entre índex Ki-67 i índex mitòtic, s'assumirà el de major grau.

4

**Presentació clínica,
diagnòstic i pronòstic
dels GEP-NENs**

4. PRESENTACIÓ CLÍNICA, DIAGNÒSTIC I PRONÒSTIC DELS GEP-NENS

4.1 Presentació clínica

Els GEP-NENs poden presentar-se amb símptomes específics o amb quadres clínic-radiològics que resulten molt poc específics i de difícil diagnòstic. La localització anatòmica del primari influeix en la seva presentació clínica i també en el seu potencial invasiu i pronòstic, donat que no tots els GEP-NENs tenen la mateixa capacitat de metastatitzar (taula 3). En l'anàlisi multivariant de 35.825 casos de NENs de la base de dades SEER nord-americana, van trobar que la localització del tumor primari era un dels factors pronòstic, així com el grau histològic, el sexe, la raça, i l'edat⁵.

Les característiques de presentació clínica poden ser molt variables, segons la producció hormonal y la pròpia localització de la tumoració primària o la presència de metàstasis. Les taules 4 i 5 resumeixen els símptomes relacionats amb les diferents NENs segons localització.

Taula 3. Freqüència de metàstasis i supervivència segons la localització del tumor primari

Localització del tumor primari	Metàstasis al diagnòstic	Supervivència a 5 anys
Budell prim	75%	65%
Còlon	60%	15%
Apèndix	<5%	60%
Estómac	25%	30%
Recte	40%	40%
Pàncrees	65%	45%

Taula 4. Presentació clínica característica de les NENs segons localització.

Localització	Amines/pèptids	Característiques clíniques	Metàstasis	Associació a MEN1
Foregut (intestí anterior)				
Bronquial, timus, estómac, primera porció duodenal, i pàncrees	5-HTP, histamina, ACTH, ADH, CRH, GH, gastrina	Obstrucció pulmonar, síndrome carcinoide atípic	Fetge, ganglis limfàtics, òssies	10%
Midgut (intestí mig)				
Segona porció duodenal, jejú, ili i còlon dret	Somatostatina, prostaglandines, bradiquinines	Obstrucció intestinal, síndrome carcinoide típic	Fetge (60-80%), Ganglis limfàtics	-
Hindgut (intestí posterior)				
Colon transvers, descendent, sigma i recte	Producció local de serotonina, pèptid YY, glicerina, neurotensina, 5-HTP, i d'altres hormones.	Trobada incidental, símptomes locals.	Fetge, òssies (5-40%)	-

Taula 5. Característiques de les NENs d'origen pancreàtic.

Nomenclatura	Amines/pèptids	Característiques clíniques	Metàstasis	Associació a MEN1
Insulinoma	Insulina, proinsulina	Neuroglucopènia	10%	5-10%
Gastrinoma	Gastrina	Síndrome de Zollinger-Ellison (úlcers pèptics, diarrea i dolor epigàstric)	60-90%	25%
VIPoma	VIP	Diarrea aquosa, hipopotassèmia i aclorhídria.	80%	10%
Glucagonoma	Glucagó	Eritema necròtic migratori, diabetis, caquèxia.	80-90%	5-17%
Somatostatina	Somatostatina	Litiasis, diabetis, esteatorrea, aclorhídria	60-70%	5-10%
Tumors no funcionants	Polipèptid pancreàtic	Síntomes relacionats amb la massa tumoral	60%	20-30%

4.2 Diagnòstic

4.2.1 Diagnòstic bioquímic

La determinació dels nivells plasmàtics de múltiples hormones peptídiques s'ha convertit en una eina essencial no només en el diagnòstic sinó també en el seguiment dels pacients amb tumors neuroendocrins. Alguns marcadors poden aportar, així mateix, una informació important sobre el pronòstic de la malaltia o la resposta al tractament. Aquests marcadors tumorals poden dividir-se en marcadors específics i generals. L'àcid 5-hidroxiindolacètic urinari (5-HIAA), el neuropèptid K, la neurotensina, la substància P i altres taquiquinines són marcadors específics de tumors originaris en tracte digestiu, mentre que la gastrina, la insulina, el pèptid C, el pèptid vasoactiu intestinal, el glucagó, la somatostatina, etc., són marcadors específics de tumors neuroendocrins d'origen pancreàtic.

En l'actualitat la determinació plasmàtica de cromogranina A es considera la prova més sensible per al diagnòstic dels TNE, especialment d'aquells localitzats budell prim. En aquest grup, diversos estudis han mostrat una sensibilitat entre el 64% i el 100%⁶. Els valors més elevats es troben en pacients amb tumors de budell prim amb metàstasis hepàtiques (sensibilitat entre el 87% i el 91%)⁷. No hi ha prou estudis en població sana per determinar l'especificitat del mètode, encara que les dades publicades suggereixen una especificitat molt elevada (86-100%), un cop exclosos pacients amb causes conegudes de resultats falsos positius, com insuficiència renal, tractament amb inhibidors de la bomba de protons o gastritis crònica

atròfica. Els seus nivells es relacionen estretament amb el volum tumoral. Els pacients amb cardiopatia carcinoide solen presentar en conjunt valors plasmàtics entre dues i tres vegades més grans que aquells sense ella. Després del tractament amb anàlegs de la somatostatina és freqüent observar una disminució en els nivells de cromogranina A, perdent-se aquesta correlació amb el volum tumoral. La elevació dels nivells de cromogranina A durant el seguiment precedeix amb freqüència a la verificació radiològica de la recidiva tumoral. Valors especialment elevats de cromogranina A s'han associat a un pitjor pronòstic, presència de malaltia simptomàtica i empitjorament de la qualitat de vida. Els nivells de cromogranina A estan freqüentment elevats en els tumors endocrins pancreàtics. La seva sensibilitat oscil·la entre el 64% i el 100% i la seva especificitat és aproximadament d'un 85%. No obstant això, es considera que les hormones específiques produïdes per cada tumor són el marcador més sensible per al diagnòstic en cada cas. La determinació de cromogranina A és especialment poc útil per al diagnòstic de l'insulinoma (sensibilitat al voltant del 10%) i, en canvi, molt útil per al diagnòstic de gastrinomes (sensibilitat pràcticament del 100%). El seu valor es relaciona amb la massa tumoral i amb la presència de metàstasis hepàtiques, excepte en el cas dels gastrinomes, que solen presentar nivells especialment elevats de cromogranina A, en relació amb la hiperplàsia de cèl·lules cromafins produïda per la hipergastrinèmia. Si bé existeixen diferències en funció del mètode emprat, en l'actualitat es considera el marcador tumoral plasmàtic més sensible per al diagnòstic dels TNE pancreàtics no funcionants (64-84%). Durant el seguiment, les variacions en els valors de cromogranina A prediuen l'evolució de la malaltia.

L'enzim neuronal específic es localitza en el citoplasma i, a diferència de la cromogranina A, no és secretada. L'elevació dels seus nivells plasmàtics en alguns TNE es deu a una alta taxa de mort cel·lular. La determinació d'enzim neuronal específic s'utilitza des de fa anys per al diagnòstic, el control de la resposta al tractament i la detecció de recidives en pacients amb carcinoma pulmonar microcític i neuroblastoma i en CNE del tracte digestiu on resulta especialment útil donada la major sensibilitat i especificitat comparada amb la cromogranina A.

Un percentatge mínim de pacients amb TNE de primari entèric (13%) i una mica més gran (45-58%) de pacients amb TNE d'origen pancreàtic (especialment no funcionants) presenten nivells elevats de polipèptid pancreàtic.

Tot i que els TNE de budell prim secreten freqüentment serotonina i aquesta es pot emprar com a marcador de la malaltia, no és fàcil mesurar els seus nivells en plasma de manera fiable per la interferència de la serotonina plaquetària. Tradicionalment, el seu producte de degradació, el 5-HIAA, ha estat determinat en orina de 24 hores per al diagnòstic. Es recomana la realització d'almenys dos determinacions en dies consecutius. S'han d'evitar aliments rics en serotonina (plàtans, nous, pinya, tomàquet, kiwi, alvocat, prunes, etc.), que poden elevar els nivells de 5-HIAA. Els metabòlits de certs fàrmacs també poden ocasionar resultats falsos positius: paracetamol, salicilats, levodopa, etc. El tractament amb inhibidors de la monoaminoxidasa impedeix la

transformació de la serotonina en 5-HIAA, i disminueix la sensibilitat de la prova, de manera que aquests s'han de suspendre almenys 48 hores abans de la determinació. La sensibilitat del 5-HIAA urinari per al diagnòstic dels tumors carcinoides és inferior a la de la cromogranina A (76% en tumors de budell prim, el 31% en tumors pancreàtics, pràcticament inútil en tumors de budell gruixut)⁸; però, la seva especificitat és clarament superior i arriba en algunes sèries al 100%. En pacients amb TNE de budell prim, els nivells de 5-HIAA urinari guarden relació amb el volum tumoral i el pronòstic de la malaltia. Els pacients amb TNE de primari bronquial no solen produir serotonina; però, de vegades, presenten una síndrome carcinoide atípica com a conseqüència de la secreció d'histamina pel tumor. En aquests casos, la determinació d'histamina i els seus metabòlits en orina de 24 hores pot ser útil per al diagnòstic i el seguiment de la malaltia. La secreció de serotonina per TNE de budell gruixut és un fet excepcional. En aquests tumors, els marcadors generals com cromogranina A solen ser d'utilitat. Així mateix, s'han descrit nivells elevats de pèptid YY i glicentina en alguns casos, que poden ser utilitzats com a marcadors més específics.

La determinació de les hormones pancreàtiques específiques és probablement el mètode més sensible i específic per al diagnòstic de insulinomes, gastrinomes, VIPomes, etc. No obstant això, amb freqüència aquestes es troben només lleugerament elevades, pel que són necessàries proves dinàmiques i test d'estímul. El dejuni prolongat segueix sent la prova d'elecció per al diagnòstic dels insulinomes. La determinació de β -hidroxibutirat durant el test de dejuni ha estat defensada com una prova amb un alt valor predictiu

negatiu que podria fer innecessari prolongar el dejuni fins a 72 hores en alguns casos. La determinació de gastrina s'ha d'acompanyar del mesurament del pH gàstric, sempre que els seus nivells siguin elevats, per evitar possibles falsos positius (gastritis crònica atrofica). Es recomana suspendre el tractament amb inhibidors de bomba de protons i anti-H2 almenys 14 i 3 dies abans, respectivament. En el cas que els nivells de gastrina basal no siguin concloents, l'estímul amb secretina ha demostrat una alta sensibilitat i especificitat (95% i 95%). Un cop realitzat el diagnòstic, la determinació de tots els pèptids pancreàtics disponibles és útil, ja que aporta informació pronòstica (els tumors que secreten dues o més hormones, exclosos la cromogranina i el polipèptid pancreàtic, s'associen a una menor supervivència) i permet utilitzar més paràmetres en el seguiment.

4.2.2 Diagnòstic per a imatge

Les tècniques híbrides de medicina nuclear, combinació d'una imatge funcional com el PET i una imatge morfològica com la TC presenten avantatges sobre la imatge funcional aïllada, com són l'augment de sensibilitat i especificitat derivat de la fusió directa de la informació anatòmica i funcional, la millor quantificació de la captació del traçador, i a més el plus d'informació derivat de la imatge de la TC. Els estudis híbrids PET / TC emprats per al diagnòstic i seguiment dels TNEs estan en permanent desenvolupament, amb la incorporació contínua de nous traçadors⁹. La possibilitat de fusionar les dades funcionals obtingudes en la PET amb les dades anatòmiques de la TC presenta avantatges en la localització anatòmica i correcció d'atenuació. A més, respecte a la

gammagrafia de receptors de somatostatina (GRS), la PET ofereix millor resolució espacial (detecta lesions de 3-6 mm enfront de 10-15 mm) i permet la quantificació de la captació del traçador en les lesions, facilitant el seguiment del pacient. El desenvolupament de nous traçadors PET per a la detecció de TNEs es fonamenta en les diferents característiques de les cèl·lules neuroendocrines: les cèl·lules neuroendocrines presenten propietats com posseir grànuls secretors, produir pèptids i amines biògenes, i expressar en grans quantitats diferents receptors de membrana. Amb base en això s'han desenvolupat dos grups de traçadors PET.

4.2.2.1 Radiofàrmacs PET que actuen sobre el metabolisme cel·lular

- 18F-fluorodeoxiglucosa (18F-FDG).
- 18F-fluorodopa (18F-LDOPA).
- 11C-5-hidroxitriptófano (11C-5-HTP).

La 18F-FDG és, amb diferència, el radiofàrmac PET més utilitzat en patologia oncològica. La seva ocupació es basa en l'augment de la glicòlisi de les cèl·lules tumorals per la seva elevada taxa de creixement i replicació. La 18F-FDG no és el traçador d'elecció en TNEs, ja que són tumors de creixement lent que no solen presentar alta avidesa per la glucosa. L'ús de la 18F-FDG s'ha de limitar als CNEs amb una taxa de proliferació augmentada. Basant-se en l'anterior, els TNEs que capten FDG presenten una taxa de creixement augmentada i, per tant, la FDG positiva és indicativa d'un pitjor pronòstic. També pot resultar d'utilitat en tumors amb baixa expressió de receptors de somatostatina com el insulinoma o el carcinoma medul·lar de tiroide. No

obstant això, el paper de la 18F-FDG en els TNEs està encara pendent de definir.

La 18F-LDOPA s'utilitza en TNEs amb base en la capacitat d'aquests tumors de captació i decarboxilació dels precursors de les amines, com 5-hidroxitriptófan i L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). S'ha descrit un augment d'activitat de la L-DOPA-descarboxilasa en els TNEs, en el 80% dels TNEs, de manera que aquest paràmetre podria ser utilitzat com un marcador de l'activitat tumoral.

4.2.2.2. Radiofàrmacs PET que actuen sobre receptors de superfície cel·lular

Les cèl·lules dels TNEs es caracteritzen per sobreexpressar receptors de somatostatina als quals s'uneixen traçadors PET com els 68Ga-DOTA-pèptids. S'han desenvolupat diferents anàlegs derivats d'octreotide, lanreotide i vapreotide:

- 68Ga-DOTA-TOC.
- 68Ga-DOTA-TATE.
- 68Ga-DOTA-NOC.

Els pèptids marcats amb 68Ga han revolucionat el diagnòstic dels TNEs, però segueixen sent molècules en fase d'investigació. Els avantatges que ofereixen respecte a la GRS són les següents: tècnicament, presenten l'avantatge que la seva síntesi i procés de marcatge és senzill. El gal·li potser obtingut de forma fàcil i econòmica a partir del generador de 68Ge / 68Ga.; L'adquisició de l'estudi PET / TAC consumeix menys temps que la GRS (dues hores en lloc de quatre i

sense imatges de 24 hores); El càlcul de l'índex SUV (standarized uptake value) permet realitzar una valoració semiquantitativa de l'activitat en regions d'interès dibuixades sobre les imatges. El SUV es defineix com el quocient entre la concentració de FDG en el tumor (expressada en NCI/g) i la dosi injectada (en NCI) dividida pel pes corporal en grams. Amb la determinació del SUV màxim dins de la lesió, que és l'índex més comunament utilitzat, es pretén valorar el grau de malignitat d'una lesió i la discriminació de lesions benignes i malignes. El SUV màxim ha demostrat recentment tenir valor pronòstic.; La major resolució espacial del tomògraf PET, en comparació amb la gammagrafia, proporciona una millor visualització de lesions petites.

El ^{68}Ga -DOTA-NOC és el radiofàrmac d'aquest grup més útil i més prometedor en el diagnòstic de TNEs, degut a la seva afinitat per major nombre de receptors (subtipus 2, 3 i 5) i a la seva dosimetria més favorable.

La PET amb aquests traçadors ofereix una major resolució de la imatge i una millor farmacocinètica en comparació amb la GRS. Ofereix resultats prometedors en la detecció del TNEs i a més proporciona informació diagnòstica rellevant en la estadificació. Un altre aspecte avantatjós és que la seva unió a receptors de somatostatina permet detectar el grau d'expressió d'aquests receptors de les cèl·lules tumorals, el que es relaciona amb el seu grau de diferenciació i és fonamental a l'hora de la planificació de la teràpia. El ^{68}Ga -DOTA-NOC mostra una elevada sensibilitat per la visualització de petites lesions, especialment ganglis i metàstasis òssies, així com tumors en localitzacions no habituals.

Les principals indicacions de les tècniques de medicina nuclear en el diagnòstic dels TNEs són les següents:

1. Localització del tumor primari desconegut.
2. Estadificació inicial i restadificació de la malaltia.
3. Selecció de pacients candidats a tractaments dirigits amb anàlegs de somatostatina valorant la presència de receptors en el tumor (de forma visual o semiquantitativa).
4. Monitorització de la teràpia.

Encara que s'accepta de forma general que els TNEs ben diferenciats són generalment de baix grau, hi ha carcinomes ben diferenciats amb un elevat índex Ki-67. Fins ara l'elecció de l'estudi gammagràfic es realitzava amb base en el grau de diferenciació tumoral. No obstant això, investigacions recents aporten evidència de la importància de l'agressivitat tumoral, independent del grau de diferenciació cel·lular.

5

**Biologia molecular
de les neoplasies
neuroendocrines**

5. BIOLOGIA MOLECULAR DE LES NEOPLASIES NEUROENDOCRINES

La combinació dels avenços oferts per tècniques clàssiques (immunohistoquímica, bioquímica clínica, imatge) i per l'estudi de la biologia molecular de les NENs està facilitant un millor i més profund coneixement d'aquests tumors. Així, mitjançant anàlisis genètiques avançades s'han identificat mutacions i alteracions específiques en gens subjacents en la gènesi de les NENs, mentre que nous estudis cel·lulars i moleculars estan permetent desxifrar la implicació de diferents factors de creixement, hormones i altres senyals endocrines, així com dels seus corresponents receptors i rutes de senyal, en la gènesi i el desenvolupament de les NENs. La informació sobre les propietats i causes de les NENs, juntament amb estudis funcionals in vivo i in vitro en models animals i cel·lulars, respectivament, ofereixen una visió més completa i detallada de les NENs, que farà possibles millors estratègies diagnòstiques i terapèutiques en el futur.

L'aplicació de diverses tècniques (seqüenciació, hibridació genètica comparada, anàlisi de pèrdua d'heterozigotitat i anàlisi de microsatèl·lits) ha demostrat que hi ha nombrosos gens i aberracions genètiques implicats en la gènesi i el desenvolupament de les NENs¹⁰. Encara que un 10% dels TNE d'origen pancreàtic s'associen a síndromes genètiques familiars hereditàries, el 90% d'ells i la majoria de les NENs apareixen de forma esporàdica, a causa de diferents aberracions moleculars, el que explica l'heterogeneïtat d'aquesta família de tumors, que acumulen múltiples canvis i defectes genètics i / o moleculars i solen presentar un grau alt d'inestabilitat cromosòmica. No obstant

això, només s'ha identificat un limitat nombre d'alteracions moleculars, associades a pèrdues i / o guanys cromosòmiques i a mutacions gèniques puntuals com esdeveniments inicials en el desenvolupament de les NENs. Així e les NENs que apareixen associades a diferents síndromes genètiques familiars hereditàries estan relacionats amb mutacions en un discret conjunt de gens (per exemple, MEN1, MEN2, VHL, NF1, TSC, complex de Carney, síndrome d'hiperparatiroidisme-tumor de mandíbula, etc.) dels que es van coneixent molts dels seus mecanismes moleculars de funcionament. Per contra, se sap encara molt poc de les alteracions moleculars subjacents en el desenvolupament de les NENs esporàdiques.

En general, les GEP-NENs no solen mostrar alteracions en l'expressió d'oncogens clàssics (src, ras, myc, fos, jun) o de gens supressors tumorals típics (p53, retinoblastoma), alguns dels quals sí estan desregulats en formes atípiques de GEP-NENs¹¹. En canvi, estudis recents revelen l'existència de multitud d'alteracions moleculars (mutacions i aberracions genètiques) amb potencial rellevància en el desenvolupament de les GEP-NENs en un conjunt de gens que, encara que en alguns casos poden estar també involucrats en el desenvolupament de GEP-NENs de tipus familiar, majoritàriament s'associen a l'aparició de GEP-NENs esporàdics.

Encara que diverses de les aberracions descobertes en diversos gens reguladors del cicle cel·lular en GEP-NENs són comuns a altres tipus de neoplàsies, cert nombre d'elles són úniques de les NENs. Una elevada proporció de NENs mostra alteracions en l'expressió o localització subcel·lular

de ciclina D14, una proteïna específica de la fase G1 / S del cicle cel·lular el paper com oncogèn es va descobrir, de fet, en adenomes paratiroides. En concret, un 65% de les NENs d'origen pancreàtic esporàdiques mostra una expressió elevada de ciclina D1 en comparació amb teixit pancreàtic sa, i la seva localització subcel·lular està alterada en el 43% de les NENs pancreàtiques. A més, el fet que la sobreexpressió de la ciclina D1 s'observa en els primers estadis de la formació de les NENs suggereix una possible implicació en la iniciació d'aquest tipus de tumors. Les proteïnes inhibidores del cicle cel·lular p21 i p27 també mostren una expressió alterada en NENs, si bé semblen exercir rols oposats en la gènesi i evolució de la patologia, ja que l'expressió de p21 es relaciona directament amb la malignitat del tumor, mentre que la de p27 ho fa inversament. Concretament, p21 es sobreexpressa en el 17,1% de les NENs gastrointestinals de baix grau i en el 66,7% dels alt grau, mentre que els nivells de p27 es relacionen inversament amb l'expressió del marcador de proliferació tumoral Ki67.

La beta-catenina constitueix un element essencial com a activador de la transcripció a la ruta de senyalització de la Wnt. Aquesta proteïna pot exercir una funció rellevant en alguns tipus de NENs, ja que un 79% de les NENs gastrointestinals mostren una activació de la beta-catenina i en un 37% d'aquest tipus de tumors es detecten mutacions en el seu gen.

APC és una proteïna amb múltiples funcions que inhibeix la beta-catenina a la ruta del Wnt i per això actua com un potent supressor tumoral. Això explica que un bon nombre de mutacions diferents en el gen APC estiguin vinculades a

l'aparició i progressió de diversos tipus de tumors. En NENs, tant en tumors invasius (60%) com en lesions premalignes (63%) colorectals, s'han identificat mutacions en el gen APC que, a més, solen aparèixer en tumors de baix grau de desenvolupament i mantenen la freqüència de mutació durant la progressió del tumor, el que suggereix que algunes mutacions en el gen APC podrien contribuir de manera rellevant al desenvolupament inicial de alguns TNE¹². A més, aquest gen s'ha trobat hipermetilat en un 65% de les NENs, el que suggereix que la metilació aberrant del gen APC podria estar implicada en la tumorigènesi molecular de les NENs.

Els supressors tumorals p16 / p14 regulen la transició del cicle cel·lular entre les fases G1 i S, mitjançant la inhibició de les quinases dependent de ciclina 4 i 6 (CDK4 i CDK6), provocant la fosforilació de la proteïna retinoblastoma. En el gen p16 / p14 (ARF) s'han identificat diferents aberracions, moltes d'elles associades a diversos tipus de NENs, entre les quals s'inclouen delecions, mutacions i metilacions, que s'han observat tant en NENs gastrointestinals com en pancreàtiques i altres NENs.

CD44 és una glicoproteïna transmembrana coneguda per la seva implicació en l'adhesió i la migració cel·lular, i vinculada més recentment amb les cèl·lules mare tumorals. En NENs gastrointestinals, s'ha observat pèrdua en l'expressió d'aquest marcador en un 55% dels casos, associada a un alt índex de metàstasi. De fet, l'expressió de CD44 en NENs gastrointestinals s'associa amb un pronòstic favorable i es relaciona inversament amb la metàstasi del tumor. A més, en NENs pancreàtiques s'han descrit diverses isoformes de CD44,

algunes d'elles associades a baixos índexs de proliferació i millor supervivència.

La trombospondina 1 és una proteïna multifuncional de la matriu extracel·lular implicada en càncer i inflamació que posseeix una notable activitat antiangiogènica (inhibeix la proliferació i migració de cèl·lules endotelials). Diferents aberracions inactivants (mutacions, metilacions) d'aquest gen s'associen amb el desenvolupament de diversos tipus de tumors, inclosos les NENs, en els quals s'han trobat metilacions aberrants en el 44% de les NENs gastrointestinals, encara que només en un 9% en els pancreàtics.

La somatostatina (SST) és un neuropèptid pleiotròpic àmpliament distribuït, produït fonamentalment en l'estómac i el pàncrees, però també en el sistema nerviós central i perifèric, que exerceix multitud de funcions biològiques (principalment inhibidores), que van des de la inhibició de secrecions exocrines i endocrines a la inhibició del creixement tumoral o neoplàsic, la qual cosa ha possibilitat l'ús dels seus anàlegs sintètics per al tractament de diverses patologies endocrines i tumorals. La SST actua mitjançant la seva unió a cinc receptors diferents, denominats SSTR1-SSTR5, inclosos en la superfamília de receptors amb 7 dominis transmembrana acoblats a proteïnes G. Els SSTRs mitjançant les accions de la SST a través de diversos mecanismes intracel·lulars de senyalització. La majoria de les GEP-NENs presenten una elevada expressió de SSTRs. No obstant això, pocs estudis han realitzat anàlisis quantitatives d'aquesta expressió o han tractat de relacionar els patrons d'expressió de SSTR1-5 amb les característiques clíniques o

patològiques de les NENs. Tanmateix, la informació disponible permet afirmar que el receptor que s'expressa amb major freqüència i abundància en les GEP-NENs és el SSTR2, present aproximadament en el 80% d'aquests tumors, en els quals controla, entre altres, la funció secretora de les cèl·lules neoplàsiques. Juntament amb SSTR2, les GEP-NENs també expressen SSTR1, SSTR3 i SSTR5, que poden contribuir al control de la secreció i, especialment, a la inducció d'apoptosi i la inhibició de la proliferació cel·lular. La internalització del complex lligand-receptor que succeeix després de la unió de SST (o els seus anàlegs) als SSTRs serveix a més com a base per al desenvolupament de pèptids radiomarcats que poden emprar-se amb fins diagnòstics o terapèutics, ja que la captació de radiolligands per les cèl·lules tumorals pot monitoritzar mitjançant anàlisi d'imatge i usar-se com radioteràpia dirigida. L'alta expressió de diferents SSTRs en GEP-NENs, especialment SSTR2, també serveix com a base per a emprar els anàlegs de SST en el tractament clínic de diverses patologies hipersecretores. El problema de la limitada vida mitjana de la SST en plasma es va solucionar amb el desenvolupament d'anàlegs sintètics amb una vida mitjana prolongada, com el octreotide i el lanreotide, que posseeixen alta afinitat per SSTR2, moderada per SSTR5 i baixa o nul·la per SSTR1, SSTR3 i SSTR4, i l'ús permet controlar la típica simptomatologia hipersecretora de les GEP-NENs funcionants. L'afinitat diferencial dels anàlegs de SST pels diferents SSTRs suggereix que el coneixement del perfil d'expressió dels diferents SSTRs en NENs permetria predir la resposta clínica d'aquests pacients al tractament. Un problema addicional en aquest context és que un nombre rellevant de pacients desenvolupen una resistència al tractament amb anàlegs de SST, els mecanismes moleculars íntims, encara poc coneguts,

podrien estar relacionats amb processos de fosforilació del receptor, desacoblament de les proteïnes G, internalització o degradació dels receptors, etc. Així mateix, en aquesta resistència podria estar implicada alguna de les noves variants truncades del receptor SSTR5 identificades recentment, que difereixen de l'SSTR5 canònic en la seva longitud, distribució subcel·lular i resposta selectiva a SST i el seu anàleg natural cortistatina.

Les GEP-NENs són tumors altament vascularitzades, propietat que s'associa a una alta expressió de molècules proangiogèniques com a factor de creixement endotelial vascular (VEGF) i angiopoyetina 2, i que al seu torn es relaciona directament amb la progressió tumoral i un pitjor pronòstic. A més, hi ha una major expressió de receptors tirosina quinasa, com els receptors 2 i 3 de VEGF, els del PDGFRs, el del factor de creixement de la insulina (IGFR1), el del factor de cèl·lules mare (c-KIT) i el del factor de creixement epidèrmic (EGFR). Després de l'activació del sistema VEGF es desencadena una sèrie de cascades de senyal que, en conjunt, estimulen el creixement endotelial, la migració i la supervivència dels vasos preexistents i la seva permeabilitat. El VEGF promou, a més, la mobilització de les cèl·lules endotelials progenitores des de la medul·la fins a llocs distants de neovascularització. Tot això ofereix una base per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques dirigides a l'angiogènesi o als receptors dels factors de creixement esmentats. En aquest sentit, l'activació de EGFR per la seva lligant (EGF) s'ha associat amb una progressió negativa dels TEP, i el nivell d'expressió del GF1R es relaciona amb el creixement tumoral, l'agressivitat i el desenvolupament de metàstasi. Per la seva banda, el receptor tirosina quinasa c-KIT, que després de ser activat per

la seva lligant indueix la dimerització i autofosforil·lació del receptor en tirosines específiques, ha passat dels dubtes inicials sobre la seva utilitat a ser considerat com un marcador molecular pronòstic d'elevat interès clínic, doncs la seva expressió s'associa a un pitjor pronòstic, més agressivitat i menor supervivència dels pacients amb NENs pancreàtiques.

La ruta fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) -Akt contribueix de manera rellevant a la proliferació cel·lular, la supervivència i la mobilitat, com indiquen estudis preclínics en NENs amb inhibidors de PI3K¹³. Les PI3K estan compostes per dos subunitats, p85 i p11, que s'activen per receptors tirosina quinasa. S'han descrit tres classes de PI3K que difereixen en la seva estructura i la seva preferència per determinats substrats. Un cop activades, catalitzen la fosforilació de fosfatidilinositol 4,5, -difosfat (PIP2) fins fosfatidilinositol 3,4,5, -trifosfat (PIP3), que al seu torn pot ser convertit en PIP2 per la fosfatasa PTEN. Per la seva banda, PIP3 activa la proteïna serina-treonina quinasa Akt (AKT), de la qual hi ha tres isoformes (Akt1-3), de les quals Akt1 és la més estudiada en càncer. Akt activa i inhibeix multitud de gens implicats en càncer, inclosos el factor nuclear kappa B, mTOR i la glucoquinasa 3 beta. En NENs intestinals s'han descrit alts nivells d'Akt i una pèrdua de la funció de PTEN.

El sistema de senyalització Ras / Raf / MEK / ERK és clau per a la diferenciació, creixement i supervivència cel·lular. La seva activació comença en la proteïna G Ras, després de la fosforilació de guanosina difosfat que comporta l'activació de Raf, una família de tres quinases citosòliques de les que Raf-1 és la més important en la diferenciació cel·lular. Un cop induït, Raf

activa al seu torn MEK i ERK. En NENs, la ruta Ras / Raf / MEK / ERK està poc o gens activada. És més, l'activació de Raf-1 redueix el creixement cel·lular i la secreció hormonal, suggerint la seva possible valor com a diana terapèutica.

mTOR és un complex molecular de senyalització que juga un paper crucial en processos de proliferació, creixement cel·lular, angiogènesi i metabolisme. La via mTOR s'altera en diferents tipus de tumors, inclosos les GEP-NENs, en els quals sol estar sobreactivada i presenta mutacions (per exemple, un 15% dels TNE pancreàtics)^{14, 15}. Per això, els components de la ruta mTOR representen atractives dianes per al desenvolupament de teràpies antitumorals. mTOR és una proteïna quinasa serina / treonina que integra dos complexos proteics (mTORC1 i mTORC2) que s'activen diferencialment i exerceixen funcions diferents, encara que íntimament relacionades. Tots dos complexos s'activen per múltiples senyals intra- i extracel·lulars, inclosos receptors tirosina quinasa i els nivells de determinats nutrients (aminoàcids, glucosa). Així, la unió d'un factor de creixement (per exemple, IGF-I, EGF, PDGF, VEGF) al seu receptor tirosina quinasa activa la via PI3K, que, al seu torn provoca la fosforilació de PIP2 i la seva conversió en PIP3. Per la seva banda, Akt s'uneix a PIP3 i activa el complex mTORC1, els substrats, S6K1 i 4EBP1, regulen, com a activador i repressor, respectivament, diversos aspectes de la síntesi proteica, el que resulta en última instància en l'estimulació de la proliferació cel·lular, supervivència i angiogènesi. Entre els reguladors negatius de mTORC1 s'inclouen el supressor de tumors PTEN, que inhibeix la senyalització de PI3K, el TSC i la proteïna quinasa supressora de tumors LKB1. Per la seva banda, el complex mTORC2 està regulat fonamentalment per PI3K i, a diferència de

mTORC1, no sembla ser sensible als nutrients o condicions nutricionals. En l'actualitat, es disposa de dues classes d'inhibidors de mTOR, els anàlegs de rapamicina i petites molècules agonistes. A la primera classe pertanyen els inhibidors al·lostèrics del complex mTORC1, que forma un complex amb l'inhibidor i bloqueja la senyalització de mTORC1, augmentant així l'activitat Akt. A la segona classe pertanyen els inhibidors del lloc actiu de la quinasa mTOR. La rellevància de la ruta mTOR no es limita a la seva acció en les pròpies cèl·lules tumorals, sinó que també influeix en processos d'angiogènesi regulant la traducció i activitat del factor induïble d'hipòxia, que al seu torn està relacionat amb l'expressió de VEGF en situacions d'hipòxia cel·lular.

Els estudis més actuals seqüenciació completa exòmica de NENs estan disponibles en tumor d'origen pancreàtic i intestinal, ben diferenciats, G1 i G2. Els resultats han demostrat una alteració genòmica molt freqüent en els gens MEN1 i DAXX/ATRX en NENs d'origen pancreàtic, amb un 15% de mutacions en gens relacionats amb la via mTOR¹⁵. En canvi, els resultats de seqüenciació exòmica en tumors d'origen intestinal ha estat molt més heterogeni, observant alteracions en la majoria de vies metabòliques relacionades amb la carcinogènesi, sense una predominança clara com succeeix en les NENs d'origen pancreàtic¹⁶.

6

**Tractament sistèmic
de les neoplàsies
neuroendocrines
avançades**

6. TRACTAMENT SISTÈMIC DE LES NEOPLÀSIES NEUROENDOCRINES AVANÇADES

6.1 Tractament hormonal i biològic

Els anàlegs de la somatostatina (SSAs) han demostrat, en nombrosos estudis, ser la millor opció terapèutica per disminuir els símptomes produïts per la hipersecreció hormonal en les NENs que expressen SSTRs. Continua sent un tema controvertit si la realització d'un rastreig de receptors de somatostatina, com per exemple l'octreoscan, que mostraria les NENs que expressen SSTRs, tindria un cert valor predictiu sobre la possibilitat de resposta simptomàtica als SSAs. Normalment poden ser controlats o disminuïts el flushing, la suor, la diarrea i el broncoespasme, amb una mitjana de control simptomàtic del 73% i de respostes bioquímiques del 51%.

Més discutida és la utilitat dels SSAs en les NENs d'origen pancreàtic. El control simptomàtic varia entre aproximadament el 50% en els insulinomes i més del 90% en els VIPomes. En aquests casos és freqüent la utilització de SSAs per al control de la secreció hormonal, tot i que l'evidència sobre la seva utilitat és menor que en tumors amb síndrome carcinoide.

Una anàlisi de la base de dades SEER va mostrar com els pacients amb NENs diagnosticats entre 1988 i 2004 tenien una mitjana de supervivència significativament superior a els diagnosticats entre 1973 i 1987 (39 vs 18 mesos, HR hazard ratio [HR] 0., 73, $p < 0., 001$)⁵. Aquest augment de la supervivència coincideix amb la introducció dels SSAs al 1987. Les revisions

dels estudis preclínics han donat suport que els SSAs tenen efecte antitumoral a través pels SSTRs, com la inhibició del cicle cel·lular i dels factors de creixement i activitat proapoptòtica. A més s'associa a efectes indirectes com la inhibició de l'angiogènesi i la modulació del sistema immune¹⁷.

El primer estudi prospectiu que demostra l'efecte antitumoral d'octreotide ha estat l'estudi PROMID(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*)¹⁸. És un estudi fase III, prospectiu, aleatoritzat, controlat amb placebo i doble cec. Es van incloure 85 pacients amb NENs d'intestí prim metastàtics, ben diferenciats (95% amb Ki-67 <2%) i que no havien rebut cap tractament previ. Es van aleatoritzar a rebre octreotide LAR 30 mg intramuscular mensualment o placebo. La mitjana de temps a la progressió (objectiu primari) va ser significativament superior en el grup que va rebre octreotide (14 vs 6 mesos, HR 0., 34, p = 0., 00007). Als 6 mesos no havia progressat el 67%del grup de octreotide comparat amb el 37% del grup placebo. És important assenyalar que no hi va haver diferències entre les NENs funcionants (39%) i no funcionants (61%), i fins i tot un 26% dels pacients no mostraven expressió de SSTRs en l'octresocan.

Lanreotide ha demostrat l'eficàcia antiproliferativa en un estudi fase III, l'estudi CLARINET(*Controlled Study of LANreotide Antiproliferative Response In NET*). És un assaig fase III, amb criteris d'inclusió diferents al PROMID: les NENs eren no funcionants i amb octreoscan positiu. A més de NENs gastrointestinals, s'inclouen NENs pancreàtiques, en ambdós casos amb uns valor de Ki-67 fins

al 10%. Els pacients es van aleatoritzar a rebre 120 mcgr de lanreotide versus placebo. L'estudi ha inclòs un total de 204 pacients i ha demostrat el seu efecte antiproliferatiu tant en NENs d'origen pancreàtic com gastrointestinal. L'estudi CLARINET va mostrar una mitjana de supervivència lliure de progressió (SLP) de 18 mesos per al grup de placebo (95% IC, 12-24.1), mentre que per als pacients tractats amb lanreotide la mitjana és de 32.8 mesos (95% IC 30.9-68), amb una hazard ràtio per progressió o mort de 0.43 (interval de confiança 95%, 0,3-0,73), amb un bon perfil de seguretat¹⁹.

L'interferó (IFN) s'utilitza per a les mateixes indicacions dels SSAs, amb l'excepció de la crisi carcinoide. No obstant això, existeixen poques dades sobre la utilitat de l'IFN en les NENs pancreàtiques. En els pacients amb NENs d'origen intestinal, l'IFN produeix una millora simptomàtica en el 30-70% dels pacients. En els pacients amb síndrome carcinoide, es produeix una millor resposta en el flushing que a la diarrea. En general, el control simptomàtic de l'IFN és comparable als SSAs, però amb un inici més retardat en el temps i un perfil de toxicitat molt més desfavorable, fet que n'ha limitat el seu us. En els pacients amb NENs tractats amb IFN, es produeix una resposta radiològica en l'11% i una estabilització en el 70% dels pacients.

Recentment, s'han presentat els resultats del primer estudi fase III aleatoritzat que ha comparat IFN + octreotide versus bevacizumab + octreotide. L'estudi ha resultat negatiu per l'objectiu primari que era incrementar la SLP a favor del braç amb bevacizumab, però ha demostrat que la combinació d'IFN +

octreotide segueix tenint un valor per al control del creixement tumoral en pacients amb NENs d'origen intestinal²⁰.

6.2 Tractament quimioteràpic

La quimioteràpia és una de les opcions terapèutiques disponibles per al tractament de les NENs metastàsiques. Tanmateix, i en contrast amb el que succeeix en la majoria de les malalties neoplàsiques en el context de malaltia avançada, no sol ser la primera opció terapèutica en una proporció important de pacients. La indicació de tractament ha de tenir en consideració múltiples factors, que inclouen factors relacionats amb el tumor (grau de diferenciació histològica, índex proliferatiu, localització del tumor primari, volum de malaltia metastàsica, velocitat de creixement tumoral), amb el pacient (edat, estat general, comorbiditat, simptomatologia), així com amb l'experiència o disponibilitat al centre d'altres alternatives terapèutiques (radionúclids, tècniques ablatives hepàtiques). Quant als factors relacionats amb el tumor, cal tenir present que certs subgrups de NENs, com els típics TNE de budell prim G1 amb índex Ki-67 <2%, poden presentar un comportament clínic molt indolent tot i ser metastàtics, i requerir a vegades anys per progressar. En aquest context, la vigilància activa sense tractament pot ser una opció raonable per a pacients asimptomàtics, i en qualsevol cas no cal oblidar que l'eficàcia de la quimioteràpia en aquests tumors poc proliferatius és escassa. Per això, la seva indicació es sol reservar per a pacients amb progressió tumoral documentada, una vegada que han fallat altres opcions terapèutiques amb menys efectes secundaris, com els anàlegs de somatostatina o les teràpies dirigides. Globalment, la quimioteràpia és més efectiva en els tumors d'origen

pancreàtic que en els d'origen entèric, i en CNE amb alt índex proliferatiu. Dades de sèries retrospectives i del RGETNE suggereixen que, a major índex proliferatiu, major sensibilitat a la quimioteràpia convencional. No obstant això, no existeix un consens sobre el punt de tall òptim per sobre del qual s'ha d'indicar un tractament de quimioteràpia. En general, la quimioteràpia pot ser la primera opció de tractament en pacients amb NENs G1/G2 d'origen pancreàtic en els quals s'hagi documentat progressió radiològica o que presentin gran volum tumoral o símptomes derivats d'això, en pacients amb CNE (Ki-67 > 20%) de qualsevol origen, i de forma més dubtosa, en NENs G2 d'origen intestinal, amb Ki67 més proper al 20% que al 3%. Finalment, les dades disponibles sobre l'eficàcia de la quimioteràpia en NENs originades a nivell colorectal són escasses, pel que és difícil establir recomanacions en aquest context.

La estreptozotocina (STZ) ha estat un dels fàrmacs més extensament emprats en el tractament de les NENs. És un antibiòtic derivat de la actinobacteria *Streptomyces achromogenes* var. *streptozoticus* amb una citotoxicitat específica de cèl·lula beta pancreàtica en models animals. El 1968 Murray-Lió va comunicar el primer cas clínic en el qual es va documentar, en una dona amb un tumor funcionant dels illots pancreàtics, una clara resposta clínica, bioquímica i radiològica a un tractament amb STZ. La primera sèrie de casos (n = 52) es publicar poc després, amb un 54% de respostes bioquímiques i un 37% de respostes radiològiques. Aquests prometedors resultats van donar lloc al primer estudi aleatoritzat dut a terme en NENs pel Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)²¹. Es van incloure a 84 pacients amb carcinomes d'illots pancreàtics avançats que van ser assignats aleatòriament a rebre STZ

en monoteràpia enfront de STZ en combinació amb 5-fluorouracil (5-FU). Els pacients que van rebre la combinació de STZ i 5-FU, comparats amb aquells que van ser tractats amb STZ en monoteràpia, van tenir una major taxa de respostes (63% enfront de 36%, $p < 0,01$) i una supervivència més prolongada (26,0 enfront de 16,5 mesos), encara que aquesta diferència no va aconseguir la significació estadística. La principals toxicitats observades van ser gastrointestinal (emesi) i renal, cap d'elles agreujada en la branca de poliquimioteràpia. La STZ, però, és poc mielotòxica en monoteràpia, la qual cosa fa que sigui un fàrmac fàcil de combinar amb altres drogues que sí que ho són com el 5-FU. En un estudi aleatoritzat posterior també coordinat pel ECOG, es va avaluar en 105 pacients amb NENs la combinació de STZ/5-FU davant STZ combinada amb doxorubicina (STZ/DOX) enfront de clorozotocina en monoteràpia, un fàrmac estructuralment similar a la STZ però menys emetògen²². En aquest estudi l'esquema terapèutic més eficaç va ser la combinació STZ/DOX, amb una taxa de respostes (biològiques o radiològiques) el 69%, enfront d'un 45% per STZ/5-FU i un 30% per a la clorozotocina ($p = 0,005$), i això es associar amb un increment significatiu del temps lliure de progressió i de la supervivència (2,2 enfront de 1,4 enfront de 1,5 anys, $p < 0,05$). Trenta pacients van ser tractats a la progressió amb un dels esquemes no assignats a primera línia. La taxa de respostes després del creuament de branques va ser del 13% en els 15 pacients tractats amb clorozotocina en segona línia i del 20% en els 15 pacients tractats amb esquemes de combinació amb STZ, i en ambdós casos les respostes van ser de curta durada. La toxicitat per als esquemes de combinació amb STZ va ser considerable, particularment la emesi i la nefrotoxicitat. La combinació de

STZ/DOX afegeix cardiotoxicitat a llarg termini i altres efectes no greus però rellevants per al pacient com és l'alopecia. Per això aquest esquema, si bé és el que ha demostrat una major eficàcia terapèutica en NENs d'origen pancreàtic, ha estat en general menys adoptat en la pràctica clínica habitual que la combinació de STZ/5-FU. En qualsevol cas, cal destacar que cap grup ha aconseguit ratificar aquestes altes taxes de resposta en sèries de pacients més recents, en els quals la resposta ha estat avaluada seguint uns criteris objectius estandarditzats (OMS o RECIST). Així, diferents grups han publicat taxes de resposta en sèries petites retrospectives que oscil·len entre el 6% i el 36% per la combinació de STZ/DOX, i una mica més grans per combinacions de tres fàrmacs com STZ/5-FU/DOX (39-54%) o STZ/5-FU/cisplatí (38%). Les dades del RGETNE també ratifiquen taxes de resposta substancialment inferiors en aquests pacients tractats amb quimioteràpia convencional, globalment del 16% per a les NENs pancreàtiques G1-2²³. Un altre fàrmac clàssic en el tractament de les NENs és la dacarbacina (DTIC), un agent alquilant sintètic la principal toxicitat és hematològica i digestiva (emesi). La DTIC va ser avaluada en un assaig de l'ECOG de fase II en el qual es van incloure 50 pacients amb NENs pancreàtiques (28 d'ells no pretractats amb quimioteràpia), amb una taxa de respostes del 33% (50% en pacients verges de tractament), encara que amb una mitjana de supervivència de tan sols 19 mesos. Més recentment, la temozolamida (TMZ) ha demostrat efectes antitumorals prometedors en NENs pancreàtiques. La TMZ és un alquilant oral que, igual que la DTIC, és convertit al seu metabòlit actiu MTIC a través d'un procés de conversió química espontània. La TMZ s'ha estudiat en diferents esquemes d'administració, sola o amb altres compostos.

En monoteràpia la seva activitat en NENs és modesta (taxa de resposta del 8%). Els resultats semblen substancialment millors en combinació amb altres agents com el bevacizumab (33%), el everolimus (35%) o la talidomida (45%). Però els resultats més destacables han estat els observats en combinació amb capecitabina, un profàrmac del 5-FU²⁴.

La quimioteràpia ha demostrat escassa activitat en els NENs d'origen entèric pel seu creixement habitualment més lent. Tenint en compte la pobra resposta d'aquests tumors a la quimioteràpia i que aquesta sol ser de curta durada, sovint és complicat decidir el moment en el qual es millor iniciar el tractament. A més, és important tenir en compte l'impacte de la toxicitat en la qualitat de vida, ja que són pacients que poden romandre anys amb la seva malaltia estable. Els estudis realitzats amb agents citotòxics en monoteràpia han mostrat un limitat benefici en NENs G1/G2 d'origen entèric, amb taxes de resposta que oscil·len del 8% al 21% per a fàrmacs com el paclitaxel, la DTIC o la DOX en estudis antics. Per contra, no s'han documentat respostes objectives amb altres fàrmacs més recentment avaluats, com el docetaxel, la gemcitabina, el topotecan o el pemetrexed. Més recentment, s'ha publicat un estudi fase II-III que aleatoritzava a 249 pacients amb NENs intestinals avançats a rebre STZ/5-FU o un esquema de combinació sense STZ (DOX/5-FU). Encara que no van existir diferències entre els dos grups pel que fa a la taxa de resposta tumoral (16%) o en la supervivència lliure de progressió (4,5 mesos), la supervivència global va ser clarament més favorable per al grup tractat amb STZ/5-FU (24,3 enfront de 15,7 mesos, $p = 0,0267$)²⁵.

Altres esquemes assajats inclouen l'associació de diferents combinacions de fluoropirimidines i oxaliplatí (oxaliplatí/capecitabina; oxaliplatí/folinat càlcic/5-FU en infusió contínua amb bevacizumab. No obstant això, aquests estudis han inclòs poblacions molt heterogènies de pacients (NENs pancreàtiques i intestinals, CNEs) i han estat comunicats només de manera preliminar, de manera que no podem extreure cap conclusió definitiva en el moment actual.

Els CNEs pobrament diferenciats comprenen al voltant d'un 10% de tots les NENs d'origen gastrointestinal. Són tumors molt agressius, de ràpid creixement i disseminació primerenca, pel que presenten un mal pronòstic, amb una supervivència mitjana estimada sense tractament d'uns 6-7 mesos, similar a la del carcinoma microcític d'origen pulmonar. La quimioteràpia és el tractament d'elecció en els CNE avançats irreseccables o metastàtics. No obstant això, si bé és cert que una proporció important de pacients respon inicialment al tractament, a causa de l'alta taxa proliferativa d'aquests tumors, les respostes solen ser de curta durada, i la evolució clínica ràpidament fatal. L'esquema terapèutic més comunament emprat en pacients amb CNE és la combinació de cisplatí i etopòsid. La primera evidència d'activitat d'aquest règim de quimioteràpia va ser publicada per Moertel et al. en una sèrie de 18 pacients en els que va documentar una taxa de resposta del 67%²⁶. En contrast, la taxa de resposta d'aquest esquema en NENs G1-2 pancreàtiques va ser del 14% i del 0% en NENs originades a l'intestí prim. Estudis posteriors han confirmat l'activitat d'aquest esquema terapèutic, encara que en general amb taxes de resposta resulten menors (27-54%) i mitjanes de supervivència de 15 a 19 mesos. Similars resultats han estat observats amb combinacions de carboplatí i

etopòsid, o de cisplatí i irinotecan. Les estratègies de tractament en segona línia estan poc definides i inclouen combinacions amb TMZ, irinotecan o topotecan. Tot i això, la majoria dels pacients mai reben una segona línia de tractament degut a la ràpida progressió i deteriorament que presenten a la progressió a primera línia. El pèssim pronòstic d'aquest tipus de tumors subratlla la imperiosa necessitat de desenvolupar noves estratègies terapèutiques en aquest context.

6.3 Tractament amb teràpies dirigides

El coneixement més detallat dels mecanismes moleculars relacionats amb el creixement cel·lular, l'apoptosi, l'angiogènesi i la invasió tumoral ha permès el desenvolupament de noves teràpies dirigides en el camp de l'oncologia, i en especial en els últims anys en l'àmbit de les NENs, principalment els TNE G1/G2 de primaris gastroenteropancreàtics i pulmonars. En aquest sentit, els resultats del recents estudis fase III han permès l'aprovació dels dos primers fàrmacs anti-diana en aquesta població de pacients: everolimus i sunitinib.

L'angiogènesi és el procés biològic de formació de nous vasos sanguinis a partir de vasculatura preexistent. La regulació de l'angiogènesi és un procés complex conseqüència del balanç entre factors pro- i antiangiogènics.. Té un paper crucial en el procés de creixement tumoral i desenvolupament de metàstasis i és considerat com un dels hallmarks al càncer. El VEGF i altres mediadors implicats en l'angiogènesi tumoral, com PDGFR i FGF (fibroblast

growth factor), estan àmpliament sobreexpressats en les NENs i el seu nivell d'expressió es relaciona amb el pronòstic. La inhibició de la via de l'angiogènesi representa una estratègia atractiva en el tractament de tumors amb rica vascularització, com són les NENs.

Sunitinib és una petita molècula, via oral, potent inhibidor, ATP-competitiu, de múltiples receptors tirosina cinasa implicats en processos de proliferació cel·lular i angiogènesi, com VEGFR1-3, PDGFR α - β , FLT-3, c-KIT i RET. En estudis preclínic es va demostrar l'efecte de la inhibició de VEGFR i PDFGR a model de xenotransplant RIP-TAG de carcinoma d'illots pancreàtics. En l'estudi fase I amb sunitinib es va observar resposta radiològica en dos pacients amb TNE i en l'assaig fase II amb sunitinib que es van incloure 66 pacients amb TNE pancreàtics, sunitinib va aconseguir una taxa de respostes del 16,7% i malaltia estable en el 68,2%, amb una taxa de supervivència lliure de progressió de 7,7 mesos. En els pacients amb tumors d'origen intestinal, la taxa de respostes va ser més baixa (2,4%) i la supervivència lliure de progressió de 10,2 mesos. Amb aquestes dades prometedores, es va iniciar un assaig fase III internacional aleatoritzat de sunitinib amb una dosi de 37,5 mg diaris en esquema continu, controlat amb placebo, en pacients amb NENs G1/G2 d'origen pancreàtic ben diferenciades que havien progressat en els sis mesos previs²⁷. L'estudi estava dissenyat per incloure 340 pacients, però es va aturar a meitat del reclutament després de la recomanació d'un comitè de monitorització independent per haver-se assolit ja l'objectiu primari d'augment en la supervivència lliure de progressió i haver detectat un augment de morts al braç placebo. Al final, l'estudi va aleatoritzar 171 pacients i va obtenir un augment en

la supervivència lliure de progressió a favor de braç de sunitinib respecte al placebo d'uns sis mesos (5,5 enfront de 11,4 mesos, hazard ratio: 0,48, $p = 0,0001$). Així mateix, es va observar un benefici clínic de sunitinib en més del 70% dels pacients, amb un 9% de taxa de respostes per criteris RECIST. Al tancament de l'estudi, també es va evidenciar un augment significatiu en la supervivència global, tot i que aquesta diferència s'ha igualat amb el creuament dels pacients del braç placebo a sunitinib. Els resultats d'aquest estudi fase III han permès l'aprovació de sunitinib per al tractament dels pacients amb NENs ben diferenciades G1/G2 d'origen pancreàtic.

La via PI3K / AKT / mTOR té un paper fonamental en la carcinogènesi de diverses neoplàsies en participar en múltiples processos de proliferació, creixement i supervivència cel·lular. Estudis preclínic han mostrat que PTEN i TSC2, fosfatases inhibidores de la via AKT / PI3K / mTOR, es troben inactives en la majoria de les NENs d'origen pancreàtics i el bloqueig de la via mTOR pot representar una interessant diana terapèutica en aquestes neoplàsies. mTOR és una cinasa serina-treonina implicada en la via de senyalització intracel·lular PI3K-AKT, amb un paper primordial en la regulació del creixement, proliferació, motilitat i supervivència cel·lular, així com en la síntesi i transcripció proteica. mTOR integra la senyalització de múltiples estímuls, com els factors de creixement similars a la insulina o el factor de creixement, i està involucrat en el procés de angiogènesis regulant la translació i l'activitat del factor induïble per la hipòxia, que està relacionat amb l'expressió de VEGF en situacions d'hipòxia cel·lular. Everolimus (RAD001) és un derivat oral de la rapamicina, inhibidor de mTOR, que ha mostrat activitat antitumoral en estudis preclínic en

línies cel·lulars tumorals i limfòcits, motiu pel qual el desenvolupament inicial del fàrmac va ser com immunosupressor. La primera evidència d'activitat en NENs digestives es va observar en un estudi fase II que va incloure 60 pacients en dos cohorts consecutives i amb dues dosis diferents de everolimus (5 i 10 mg). La primera cohort de 30 pacients rebre everolimus 10 mg diaris i octreotide LAR 30 mg intramuscular cada 28 dies. La segona cohort va rebre everolimus en monoteràpia. L'estudi va demostrar una activitat prometedora amb una taxa de respostes del 17% en NENs d'intestí prim i el 27% en NENs d'origen pancreàtic. L'activitat de everolimus va ser superior en la cohort de 10 mg / dia, el que confirma les dades farmacodinàmiques de l'estudi fase I previ amb everolimus en tumors sòlids. Donats els interessants resultats obtinguts, es van dur a terme els estudis RADIANT per explorar el paper d'everolimus en GEP-NENs i en NENs ben i moderadament diferenciades pulmonars (carcinoides típics i atípics).

El RADIANT-1 (RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors) va ser un estudi internacional fase II confirmatori inicial realitzat en 160 pacients amb NENs avançades d'origen pancreàtic, 115 casos tractats amb everolimus en monoteràpia amb 10 mg / dia i 45 associat a octreotide 30 mg intramuscular cada 28 dies. En monoteràpia, la taxa de respostes va ser del 9,6%, amb una taxa d'estabilitzacions del 67,8% i una supervivència lliure de progressió de 9,7 mesos. Posteriorment s'han publicat els resultats dels tres estudis regulatoris d'everolimus en NENs, els RADIANT 2, 3 i 4 que són tres estudis fase III, internacionals, doble cec, controlats amb placebo, en pacients amb NENs extrapancreàtics clínicament funcionants (RADIANT-2), NENs pancreàtiques (RADIANT-3) i NENs gastrointestinals i pulmonars no funcionants (RADIANT-

4)²⁸⁻³⁰. En resum, everolimus ha demostrat de forma estadísticament significativa un increment en la supervivència lliure de progressió en NENs G1/G2 d'origen pulmonar, pancreàtic i gastrointestinal, aconseguint l'aprovació per al tractament dels pacients amb NENs G1/G2 amb tumors primaris en pràcticament totes les localitzacions anatòmiques.

Els estudis amb teràpies dirigides en NENs G3 ha estat molt limitada i amb resultats decebedors. Afegida a l'agressivitat i la complexitat de l'estudi d'un grup de neoplàsies molt heterogeni i relativament poc freqüent dins la incidència reduïda de les NENs, l'escàs coneixement de les bases moleculars dels CNEs ha limitat el desenvolupament de teràpies dirigies en aquesta població de pacients, impeding la millora de la supervivència en un grup de pacients amb especial mal pronòstic.

7 **Caracterització genòmica en oncologia**

7. CARACTERITZACIÓ GENÒMICA EN ONCOLOGIA

Durant els últims 40 anys, els esforços en identificar les alteracions genòmiques somàtiques responsables de la formació de diferents tipus de càncers han revolucionat la visió de la oncologia i han permès iniciar el camí a la personalització del tractament³¹. Durant els anys següents, les aberracions cromosòmiques han anat guanyat cada vegada més importància com a biomarcadors pronòstics i predictius del càncer. Referent a això, el càncer de bufeta es va convertir en un dels primers tumors sòlids per als que anormalitats genòmiques es van incorporar en un algoritme pronòstic³². Alhora, molts descobriments científics bàsics i traslacionals han revolucionat la nostra comprensió fonamental de càncer. El reconeixement que els gens relacionats amb el càncer (oncogens i supressors de tumors) comprenen variants de gens normals que han estat pertorbats per alteracions cromosòmiques van donar suport la premissa que l'alteració genòmica va causalment lligada a la carcinogènesi, la progressió del tumor, i la resposta al tractament.

Durant els anys 80, es van identificar tres categories fonamentals de les aberracions genòmiques del càncer: mutacions puntuals de bases de nucleòtids (substitució, inserció o deleció), alteració en el número de còpies (pèrdua o guany) i translocacions o reordenaments. Les modificacions epigenètiques de l'ADN genòmic o de les histones a través de metilació, acetilació, i altres mecanismes també van ser reconeguts com a mediadors clau en el fenotip del càncer³³.

En els últims anys, els avenços tecnològics han permès revolucionar la capacitat de seqüenciació de l'ADN, passant de mètodes basats en la seqüenciació Sanger iniciada a finals dels anys 70, a tecnologies de seqüenciació en paral·lel que han reduït el cost per nucleòtid seqüenciat dràsticament fins a fer accessible als grups d'investigadors independents les tècniques més avançades i precises de seqüenciació massiva de l'ADN. Els primers articles publicats de seqüenciació completa del genoma del càncer es van centrar en genomes individuals de la leucèmia mieloide aguda³⁴, el càncer metastàtic de mama, melanoma^{35, 36}, i càncer de pulmó de cèl·lules petites³⁷. La seqüenciació del genoma complet del càncer requereix aproximadament 30 vegades la profunditat mitjana de la cobertura, que ascendeix 90 mil milions de nucleòtids seqüenciats per mostra. Tant el tumor com l'ADN germinal de l'hoste s'han de seqüenciar paral·lelament per a identificar les variants somàtiques relacionades amb els processos de carcinogènesi. Tot i que el cost de la generació d'aquesta magnitud de seqüenciació d'ADN s'ha reduït, les dades generades segueixen sent considerables. Per aquest motiu, l'adaptació de panells de mutacions rellevants en diferents tipus de tumors s'han generalitzat amb l'objectiu de reduir el cost, optimitzar les troballes rellevants des d'un punt de vista terapèutic i agilitzar el procés d'obtenció dels resultats per a poder aplicar-ho a la pràctica clínica diària.

L'elaboració dels panells amb les alteracions genòmiques en oncogens i gens supressors de tumor proporciona un conducte fàcil a través del qual la biologia bàsica del càncer pot guiar l'oncologia clínica. El coneixement de les alteracions genòmiques característiques d'una neoplàsia permet tant precisar

el diagnòstic com oferir opcions de tractament precis per a l'alteració diana identificada. La convergència resultant de la genètica del càncer, la biologia del tumor i els fàrmacs en desenvolupament ha donat com a resultat la identificació d'alteracions essencials, o *driver*, que ofereixen al càncer una avantatge evolutiva i una dependència, que per altra banda, pot permetre el tractament dirigit i eficaç d'un tipus de càncer en un pacient determinat. Tot i que el control a llarg termini dels tumors, sens dubte, requerirà de combinacions de múltiples fàrmacs, l'evidència actual demostra que molts tumors es tornen altament dependents de la funció de fins i tot un sol oncogen per a la proliferació i la supervivència, tot i la presència de moltes altres alteracions genòmiques i epigenètiques. Weinstein va introduir el terme "*oncogene addiction*" per descriure aquest fenomen³⁸. L'addicció d'un tumor a un determinat oncogen denota un context cel·lular en què la xarxa de senyalització es desajusta suficientment per la presència d'una oncoproteïna mutada que aquesta proteïna juga un paper molt més important en el desenvolupament maligne que la proteïna normal. En l'apropiat entorn clínic, el fenomen d'addicció tumoral pot crear una finestra terapèutica per a fàrmacs dirigits. Les mutacions en el gen *KRAS* representen un exemple il·lustratiu d'un oncogen *driver* molt prevalent, essent la proteïna corresponent refractària a múltiples esforços terapèutics, però en el que s'estan desenvolupant diverses teràpies dirigides contra altres proteïnes de la mateixa via metabòlica amb resultats esperançadors que permetrien bloquejar la via sense interaccionar amb la proteïna mutada (fet conegut com a addicció no oncogènica per reflectir el fet que moltes d'aquestes proteïnes diana no són en si mateixes subjectes d'alteracions genòmiques recurrents)³⁹.

En l'actualitat estan disponibles diverses plataformes genòmiques tant comercials com elaborades en funció de les necessitats de cada centre de recerca, que permeten la ràpida identificació de les alteracions en l'ADN tumoral i facilitar la teràpia de precisió més adequada per a cada pacient. En aquest sentit, programes de *prescreening* molecular com el dut a terme per l'Institut Oncològic Vall Hebron (VHIO) han permès tant optimitzar la identificació de les alteracions moleculars dels pacients oncològics i oferir-los-hi l'estudi clínic amb el fàrmac dirigit a l'alteració molecular considerada com a *driver* en cada cas, com la utilització de les plataformes VHIOCard per a la recerca i caracterització molecular de neoplàsies poc estudiades fins al moment.

8 Justificació

8. JUSTIFICACIÓ

Els CNEs de tracte digestiu són tumors poc freqüents i d'elevada complexitat de maneig. El pronòstic del pacients afectes de CNEs és molt pobre, i les opcions de tractament limitades o inexistent. Dins del grup de CNEs d'origen digestiu, trobem tant tumors primaris pancreàtics, com gastrointestinals. Un dels tumors més agressius són els originats en el còlon, habitualment amb índex de proliferació cel·lular molt elevats (>50%), amb escassa resposta a la combinació de quimioteràpia més habitual (platí-etopòsid) i amb un pronòstic molt pobre.

Els esforços per conèixer les alteracions moleculars responsables de les NENs digestives s'ha focalitzat principalment en tumors d'origen pancreàtic, intestinal i pulmonar, tots ells ben diferenciats, G1/G2. En canvi, el coneixement sobre la biologia molecular responsable del desenvolupament dels CNEs digestius és molt limitat, fet que ha condicionat el desenvolupament de teràpies dirigies en aquest tipus de tumors.

En la present tesi doctoral presentem un estudi molecular dels CNEs de primari colònic des del punt de vista de la genòmica i la epigenètica. La dificultat en la identificació i l'obtenció de mostres tumorals de pacients amb CNEs de primaris colònics ha requerit de la col·laboració del Grup Español de Tumors Endocrins (GETNE) degut a la baixa incidència d'aquesta neoplàsia.

L'estudi genòmic s'ha dut a terme al laboratori de genòmica del càncer del VHIO, l'estudi epigenètic al Grup d'Epigenètica del Càncer, Programa d'Epigenètica i Biologia del Càncer (PEBC) de l'Hospital Duran i Reynals i la confirmació en models murins derivats de pacients (patient derived tumor xenografts, PDX) al Grup de Cèl·lules Mare i Càncer del VHIO.

Els resultats de la present tesi doctoral permetran aprofundir en el coneixement de la biologia molecular dels CNEs d'origen colònic, identificar nous biomarcadors predictius de resposta a teràpies dirigies específiques i proporcionar el racional molecular i traslacional per al desenvolupament d'estudis clínics dirigits a aquesta població de pacients.

9 Hipòtesis

9. HIPÒTESIS

9.1 Principals

- 1.- El coneixement de la biologia molecular dels CNEs de primari colònic és molt limitat y la descripció de les alteracions genòmiques i epigenètiques és primordial per a poder avançar en el tractament d'aquestes neoplàsies
- 2.- No existeixen models murins derivats de pacients (PDX) afectes de CNEs d'origen colònic. La seva creació ens permetrà testar diferents tractament en funció dels biomarcadors identificats en el punt anterior.

9.2 Secundaries

- 1.- La genòmica del CNE de còlon pot ser diferent de la de l'adenocarcinoma colònic
- 2.- La epigenòmica del CNE de còlon pot ser diferent de la de l'adenocarcinoma colònic
- 3.- La teràpia dirigida en funció de l'alteració molecular observada pot ser superior a la quimioteràpia estàndard en CNE colònic en els PDXs
- 4.- La identificació de biomarcadors predictius de resposta a teràpies dirigides per a facilitar el disseny d'estudis clínics per a pacients amb CNEs colònics.

10
Objectius

10. OBJECTIUS

10.1 Primaris

- 1.- Determinar les alteracions moleculars en el DNA tumoral de pacients afectes de CNEs de primari colònic
- 2.- Determinar les alteracions epigenètiques dels CNEs colònics

10.2 Secundaris

- 1.- Comparar les alteracions moleculars en DNA tumoral del CNE de còlon amb les observades en l'adenocarcinoma de còlon
- 2.- Comparar les alteracions epigenòmiques en CNEs colònics amb les observades en l'adenocarcinoma de còlon
- 3.- Desenvolupar un model de PDX amb CNE colònic
- 4.- Testar tractament dirigits en el model de PDX i comparar-ho amb la quimioteràpia estàndard
- 5.- Dissenyar un estudi clínic per a pacients amb CNE colònic en funció de les alteracions moleculars observades i els biomarcadors identificats

11
Mètodes

11. MÈTODES

11.1 Tipus d'estudi

Es tracta d'un estudi traslacional, on s'han identificat 25 mostres de pacients amb CNE d'origen colònic en quatre hospitals associats al GETNE: Hospital Universitario Central de Asturias de Oviedo, Hospital Universitario Ramon y Cajal de Madrid, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander i l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

11.2 Selecció de la mostra

Els pacients identificats per a l'estudi corresponen a pacients inclosos dins el registre del GETNE, per tant, disposen de consentiment informat adequat.

Totes les mostres rebudes s'han identificat i confirmat com a CNE segons la classificació de la OMS per una única patòloga especialitzada en NENs del servei d'anatomia patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

11.3 Anàlisi molecular genòmic de les mostres

El mètode de treball ha consistit en l'extracció de DNA de les mostres de tumors en parafina utilitzant l'instrument Maxwell 16 (Promega), seguit d'amplificació de tot el genoma (Repli-g, QIAGEN) en cas d'obtenir <600 ng. Es requereix de 600 ng de DNA per realitzar el perfil mutacional utilitzant la VHIOCard. VHIOCard és un panell dissenyat al laboratori de Genòmica del Càncer (VHIO) especialment dissenyat per analitzar les mutacions somàtiques més freqüents observades en un ampli panell de tumors sòlids, inclosos els tumors neuroendocrins (basat en la base de dades COSMIC: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). VHIOCard permet genotipar

fins a 700mutacions i petits indels en 70 gens relacionats amb el càncer. Breument, després de la quantificació (Nanodrop) i dilució del DNA genòmic a 10 ng/ml, es realitza una reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per amplificar les regions genòmiques adjacents als loci que seran genotipats (volum de 5-ml conté 0.1 unitats de *Taqpolymerase*, 20 ng de DNA genòmic, 2.5 pmol de cada "primer" de PCR i 2.5 mmol de desoxirribonucleòtids trifosfat, dNTPs). La reacció d'amplificació s'ha dut a terme en un termociclador. Els dNTPs no incorporats són desactivats amb l'addició de fosfatasa alcalina (0.3 U) i incubació durant 40 minuts a 37°C seguit d'inactivació de l'enzim per calor durant 5 minuts a 85°C. Després, cada mutació s'analitza com a producte d'extensió d'una sola base (s'utilitzen dNTPs en presència de Taq polimerasa) d'una sonda que hibrida de forma immediatament contigua a la posició de la mutació. Després de l'addició d'una resina d'intercanvi catiónic per eliminar les sals residuals de la reacció, es dipositen 7 nl del producte d'extensió a la matriu (àcid 3-hidroxipicolínic) d'un xip Gen II SpectroCHIP (Sequenom). Els Gen II SpectroCHIPS són analitzats utilitzant un espectròmetre de masses (*matrix-assisted laser desorption / Ionization-time of flight* (MALDI-TOF) *mass Spectrometer* (MassARRAY, Sequenom).

Taula 6. Gens analitzats en la VHIOCard

ABL1	AKT1	AKT2	ALK	APC
BRAF	CDH1	CDK4	CDKN2A	CSF1R
CTNNB1	Dear1	EGFR	ERa	ERBB2
FBXW7	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FLT3
FRAP	GATA1	GNA11	GNAQ	GNAS
GSK3B	HIF1A	HRAS	IDH1	IDH2
IGF1R	JAK1	JAK2	JAK3	KIT
KRAS	MAG	MAP2K4	MEK1	MET
MLH1	MPL	MSH6	MYC	NF2
NF3	NOTCH1	NOTCH4	NRAS	PDGFRA
PIK3CA	PIK3R1	PIK3R5	PRKAG1	PRKAG2
PTCH1	PTEN	RB1	RET	RICTOR
RUNX1	SMAD4	SMARCB1	SMO	SRC
STK11	TNK2	TP53	VHL	WT1

11.4 Anàlisi de metil·lació de l'ADN mitjançant tecnologia microarray

En 23 de les mostres de CNE de còlon es va dur a terme un estudi del seu perfil de metil·lació i es va comparar amb 30 adenocarcinomes colorectals. La determinació dels perfils de metil·lació de l'ADN dels tumors es va realitzar usant l'estratègia basada en microarrays de metil·lació d'ADN "Infinium Human Methylation Bead Chip" (Illumina), seguint els protocols subministrats pel

fabricant. L'extracció de l'ADN de les mostres incloses en parafina es va realitzar utilitzant el kit "Infinium HD FFPE DNA Restoration" (Illumina) per assegurar l'adequada qualitat del material genètic. Les mostres de CNE de còlon van ser analitzades utilitzant la recent aproximació Infinium Human Methylation EPIC, que permet la tipificació de més de 850.000 llocs CpG, cobrint sobre un 99% de gens RefSeq. Les dades obtingudes van ser analitzades de manera conjunta i comparades amb les derivades de l'aproximació 450K, usada anteriorment en la determinació dels patrons en mostres d'adenocarcinoma colorrectal, obtingudes de la base de dades COAD del "*The Cancer Genome Atlas*" (TCGA, USA). Anteriorment, ja havia estat descrita la viabilitat analítica de la comparació entre aquestes dues aproximacions, que es diferencien, bàsicament, pel número de posicions de metil·lació (CpGs) que són capaces de detectar (al voltant de 450.000 versus més de 850.000), però que es regeixen pels mateixos criteris analítics.

Les dades epigenòmiques obtingudes van ser exportades al paquet estadístic R, realitzant la normalització dels valors d'intensitat de fluorescència usats per calcular els nivells de metil·lació (valor β). Les diferències de metil·lació entre ambdues neoplàsies (CNE i adenocarcinoma de còlon) van ser identificades a través de l'anàlisi supervisada per "hierarchical clustering" detectant, mitjançant la funció ANOVA, els canvis estadísticament significatius, és a dir, amb un p-valor inferior a 0.01, en les posicions CpGs comunes entre 450K i 850K. Posteriorment, es va avaluar el percentatge de canvis de metil·lació, considerant els canvis no significatius com a patrons comuns entre ambdues neoplàsies i els significatius com a patrons diferencials. Es van identificar els gens diferencials entre neoplàsies més representatius, a partir del seu

contingut de posicions de metil·lació (CpGs) que presentaven canvis significatius.

11.5 Anàlisi de la inestabilitat de microsatèl·lits

L'anàlisi dels gens reparadors de l'ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*) es va dur a terme per immunohistoquímica utilitzant el procediment estàndard (streptavidin-biotin-peroxidase) i per reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzant els panell estàndards per a la determinació de l'estat de microsatèl·lits emprada en adenocarcinoma de còlon.

11.6 Experiment amb PDX derivat de pacient amb CNE colònic

Els experiments es van dur a terme seguint la directiva de la cura dels animals de la Unió Europea (2010/63/UE) i van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal del VHIR - Vall d'Hebron Institut de Recerca (ID: 40/08 CEEA i 47/08/10 CEEA). Els ratolins NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl) van ser adquirits dels laboratoris Charles River. Prèvia obtenció de consentiment informat per escrit, 1×10^5 cèl·lules derivades del pacient afecte de CNE de primari colònic portador de mutació V600E en BRAF en suspensió en PBS es van barrejar amb Matrigel® (1: 1 v/v de relació; BD Biosciences) i es van injectar per via subcutània en els dos flancs de ratolins NOD/SCID.

Un cop aconseguits els PDX viables i quan el tumor va aconseguir 0,5 cm³ de volum, els ratolins van ser distribuïts aleatòriament en diferents grups de tractament. El cisplatí (3 mg/kg), etopòsid (5 mg/kg) i cetuximab (20 mg/kg) s'administren mitjançant injecció intraperitoneal, mentre que LGX818, inhibidor

selectiu de BRAF, (20 mg/kg en 1% de Tween 80 i 1% de carboximetilcel·lulosa) es va administrar per sonda oral. El cisplatí s'administra un cop per setmana, etopòsid i cetuximab dues vegades per setmana i un cop al dia LGX818. Quan els ratolins coincideixen amb els criteris de punt final van ser sacrificats i es van realitzar necròpsies completes. Els tumors subcutanis es van recollir per a l'anàlisi histològic. Una mostra de cada xenoempelt de tumor es va congelar en nitrogen líquid immediatament després de l'extracció i es va mantenir a -80 °C.

Es van obtenir mostres dels PDX per a confirmar que preservaven la morfologia de CNE de còlon i es va realitzar estudi genòmic utilitzant VHIOCard per a confirmar la presència del mateix perfil mutacional que el pacient de qui derivava.

12 **Resultats**

12. RESULTATS

12.1 Resultats de l'estudi genòmic

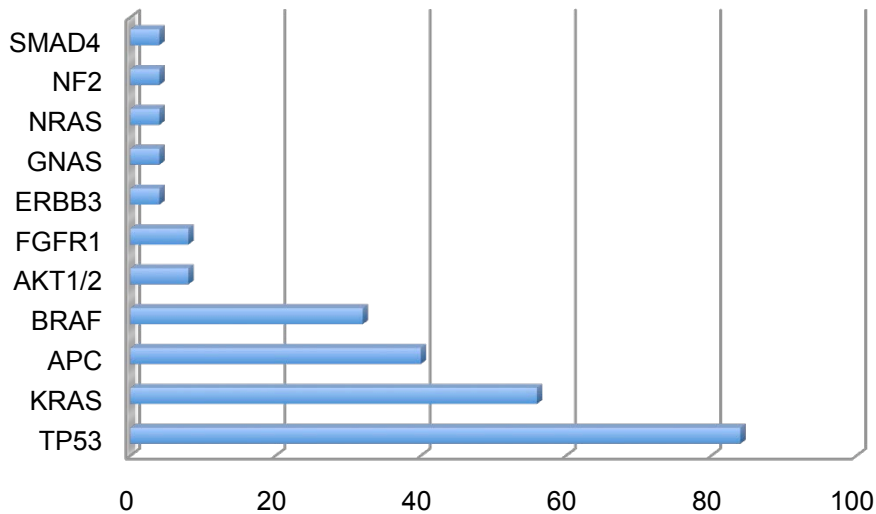
S'han objectivat un total de 62 mutacions en les 25 mostres de CNE d'origen colònic estudiades a través de la VHIOCard i estan resumides en la taula 7. La freqüència de mutacions trobada en els diferents gens va ser per a *TP53* del 84%, *KRAS* 56%, *APC* 40%, *BRAF* 32%, *AKT1/3* 8%, *FGFR1* 8%, i *ERBB3*, *GNAS*, *NRAS*, *NF2* i *SMAD4* en un 4% (figura 4). Les mutacions en el gen *APC* s'han observat en tots els casos associades a altres mutacions. S'han observat mutacions concomitants en la mateixa mostra en el 52% dels casos per als gens *TP53* i *KRAS* i en el 28% en el cas de *TP53* i *BRAF*. En canvi, les mutacions en *BRAF* i *KRAS* han resultat mútuament excloents.

Taula 7. Descripció de les mutacions identificades amb la VHIOCard

AKT1:NM_005163:exon3:c.G49A:p.E17K
AKT3:NM_005465:exon2:c.G49A:p.E17K
APC:NM_000038:exon16:c.2626C>T:p.R876X
APC:NM_000038:exon16:c.3921_3925del:p.L1307fs
APC:NM_000038:exon16:c.3955delC:p.P1319fs
APC:NM_000038:exon16:c.4233delT:p.S1411fs
APC:NM_000038:exon16:c.4462_4469del:p.L1488fs
APC:NM_000038:exon16:c.4600dupG:p.N1533fs
APC:NM_000038:exon16:c.A4108T:p.K1370X
APC:NM_000038:exon16:c.G3856T:p.E1286X
APC:NM_000038:exon16:c.G4033T:p.E1345X
APC:NM_000038:exon16:c.G4057T:p.E1353X
BRAF:NM_004333:exon11:c.G1405A:p.G469R
BRAF:NM_004333:exon15:c.1799T>A:p.V600E
BRAF:NM_004333:exon15:c.1799T>A:p.V600E
BRAF:NM_004333:exon15:c.1799T>A:p.V600E
BRAF:NM_004333:exon15:c.1799T>A:p.V600E
BRAF:NM_004333:exon15:c.1799T>A:p.V600E
BRAF:NM_004333:exon15:c.1799T>A:p.V600E
BRAF:NM_004333:exon15:c.1799T>A:p.V600E
ERBB3:NM_001982:exon3:c.310G>A:p.V104M
FGFR1:NM_015850:exon10:c.1393G>A:p.E465K
FGFR1:NM_015850:exon12:c.1642G>A:p.A548T
GNAS:NM_000516:exon8:c.G602A:p.R201H
KRAS:NM_004985:exon2:c.34G>A:p.G12S
KRAS:NM_004985:exon2:c.34G>T:p.G12C
KRAS:NM_004985:exon2:c.35G>A:p.G12D
KRAS:NM_004985:exon2:c.35G>A:p.G12D
KRAS:NM_004985:exon2:c.35G>A:p.G12D
KRAS:NM_004985:exon2:c.35G>C:p.G12A
KRAS:NM_004985:exon2:c.G34T:p.G12C
KRAS:NM_004985:exon2:c.G35A:p.G12D
KRAS:NM_004985:exon2:c.38G>A:p.G13D
KRAS:NM_004985:exon2:c.G38A:p.G13D
KRAS:NM_004985:exon2:c.G38A:p.G13D
KRAS:NM_004985:exon2:c.G38A:p.G13D
KRAS:NM_004985:exon2:c.G38A:p.G13D
KRAS:NM_004985:exon3:c.A182G:p.Q61R
KRAS:NM_004985:exon3:c.C181A:p.Q61K
NF2:NM_000268:exon8:c.785G>A:p.R262Q
NRAS:NM_002524:exon3:c.C181A:p.Q61K
SMAD4:NM_005359:exon10:c.1150_1158del:p.G384_G386del
TP53:NM_000546:exon5:c.514G>T:p.V172F
TP53:NM_000546:exon5:c.524G>A:p.R175H

TP53:NM_000546:exon5:c.524G>A:p.R175H
TP53:NM_000546:exon5:c.524G>A:p.R175H
TP53:NM_000546:exon5:c.524G>A:p.R175H
TP53:NM_000546:exon5:c.C548A:p.S183X
TP53:NM_000546:exon5:c.G427A:p.V143M
TP53:NM_000546:exon5:c.G437A:p.W146X
TP53:NM_000546:exon5:c.G524A:p.R175H
TP53:NM_000546:exon5:c.G524A:p.R175H
TP53:NM_000546:exon6:c.586C>T:p.R196X
TP53:NM_000546:exon6:c.626_627del:p.R209fs
TP53:NM_000546:exon6:c.646G>A:p.V216M
TP53:NM_000546:exon7:c.733G>A:p.G245S
TP53:NM_000546:exon7:c.742C>T:p.R248W
TP53:NM_000546:exon7:c.742C>T:p.R248W
TP53:NM_000546:exon7:c.C742T:p.R248W
TP53:NM_000546:exon8:c.797G>A:p.G266E
TP53:NM_000546:exon8:c.814G>A:p.V272M
TP53:NM_000546:exon8:c.844C>T:p.R282W
TP53:NM_000546:exon8:c.818G>A:p.R273H

Figura 4. Freqüència de mutacions identificades mitjançant la VHIOCard



12.2 Resultats de l'anàlisi de metil·lació de l'ADN mitjançant tecnologia microarray

De les 23 mostres inicials, s'han obtingut resultat de 19 (descantant-ne quatre per baixa qualitat de les lectures). En total, les posicions comparables de CpGs eren unes 440.000, havent seleccionat 336.575 posicions finals CpGs amb lectures de molt bona qualitat. El 17% de les CpGs analitzades mostren diferències estadísticament significatives. Els resultats de la metil·lació de les mostres de CNE i adenocarcinoma de còlon mostren dos clústers clarament diferenciats i força homogenis (figura 5). S'observen dos grups amb comportament clarament diferenciats en les CpGs localitzades en CpGs "Islands", demostrant una clara menor metil·lació en ambdós grups. Les CpGs "Islands" són zones del genoma amb un contingut de citosines i guanines molt més ric que la majoria del genoma. Gran part d'elles són llocs d'iniciació de la

transcripció, el silenciament de la qual acostuma a dependre de la metil·lació en bloc d'aquestes CpGs. Aquestes diferència en l'estat de metil·lació s'observen de forma força homogènia al llarg de tot el genoma. El grau de metil·lació es discretament inferior en les mostres de CNE de forma general, tot i que s'observen diferències significatives en superiors al 10% de metil·lació en el 54% de les 55.804 CpGs significativament diferents entre ambdós grups de tumors i en més d'un 25%, la diferència és superior al 20% (figures 6 i 7).

L'elevat nombre de CpGs diferentment metil·lades en ambdues neoplàsies ha permès buscar regions senceres amb canvis de patró de metil·lació entre l'adenocarcinoma de còlon i el CNE. S'han identificat 526 regions amb diferències estadísticament significatives ($p < 0.01$) entre CNE i adenocarcinoma de còlon. De nou, s'observen variacions significatives entre ambdós tumors, observant regions de major metil·lació en l'adenocarcinoma, i viceversa, amb una tendència a la menor metil·lació en l'ADN dels CNE de còlon (figura 8).

Figura 5. Estat de metil·lació de les mostres de CNE i adenocarcinoma de còlon, diferenciant clarament dos clústers de metil·lació tant en CNE com en adenocarcinoma de còlon.

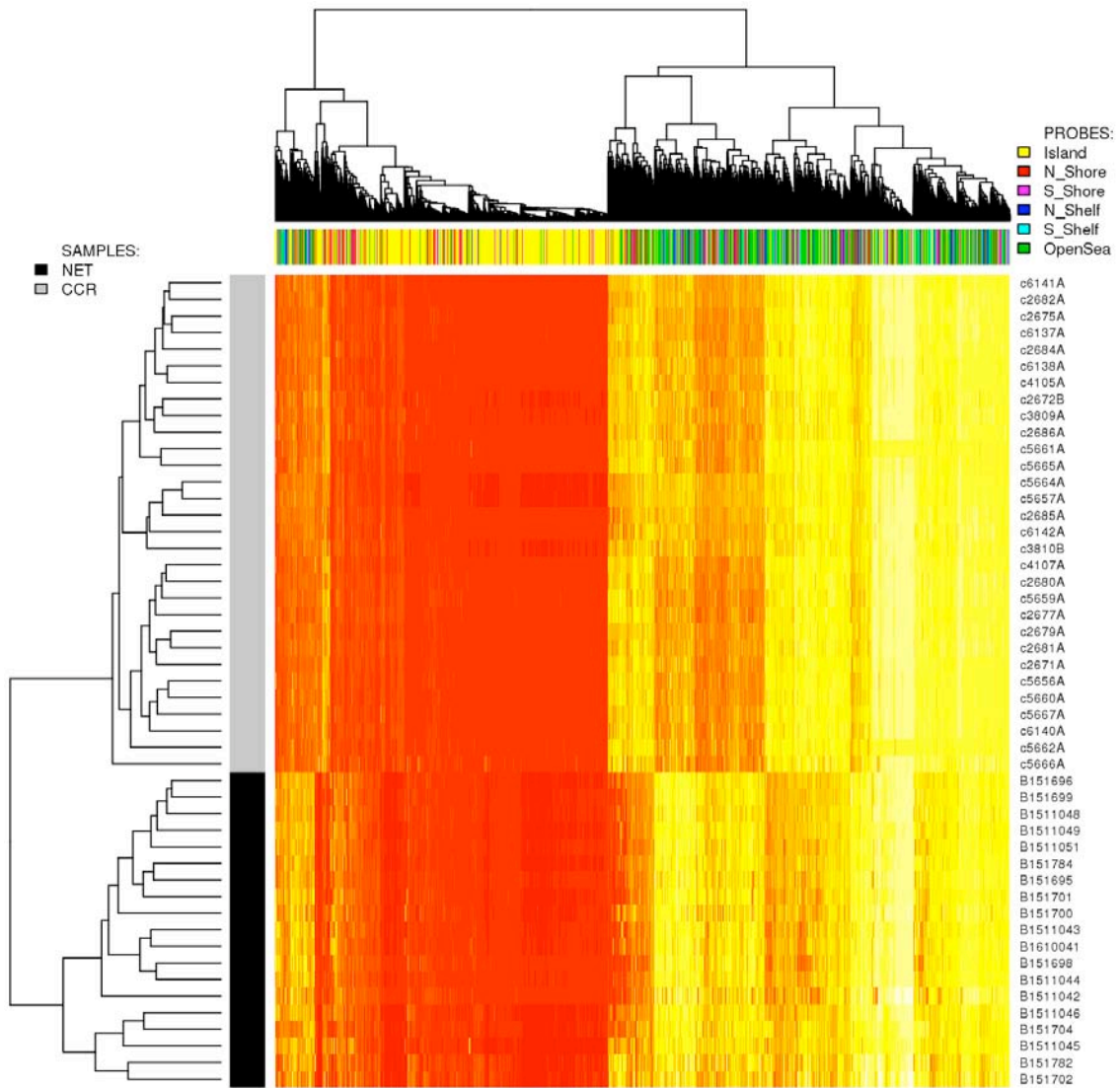
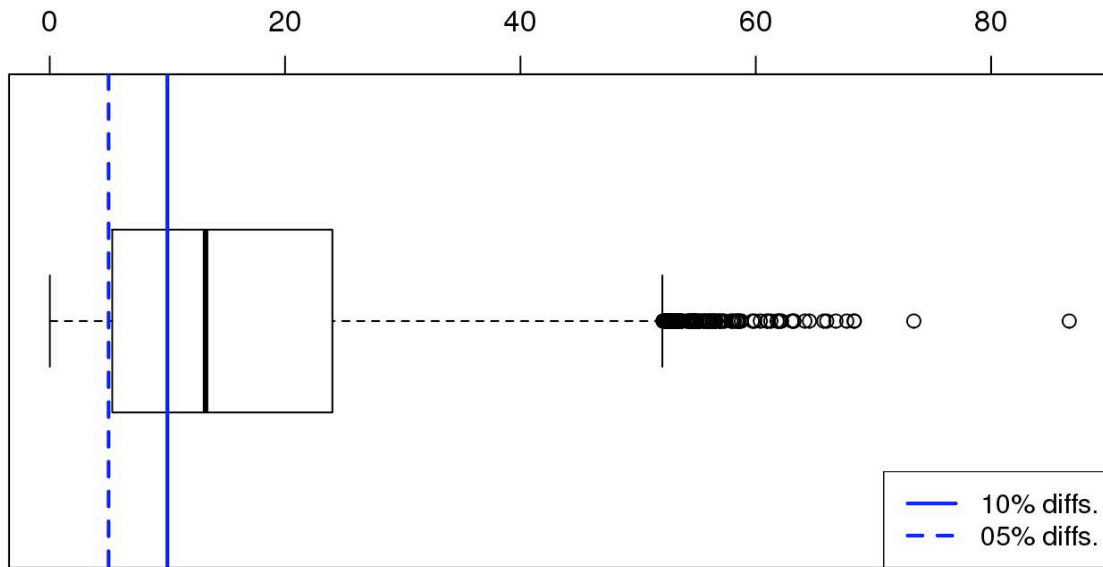


Figura 6. Diferències significatives entre els nivells de metil·lació entre les mostres de CNE i les d'adenocarcinoma de còlon, observant més del 10% de diferència en el 58% dels casos i més del 20% en el 25% dels casos.



Figures 7. Exemples de metil·lació diferencial entre CNE i adenocarcinoma de còlon. En el primer cas s'observa una major metil·lació de l'adenocarcinoma de còlon (24% superior). En canvi, en el segon cas, s'observa una metil·lació significativament superior en el CNE (un 63% superior).

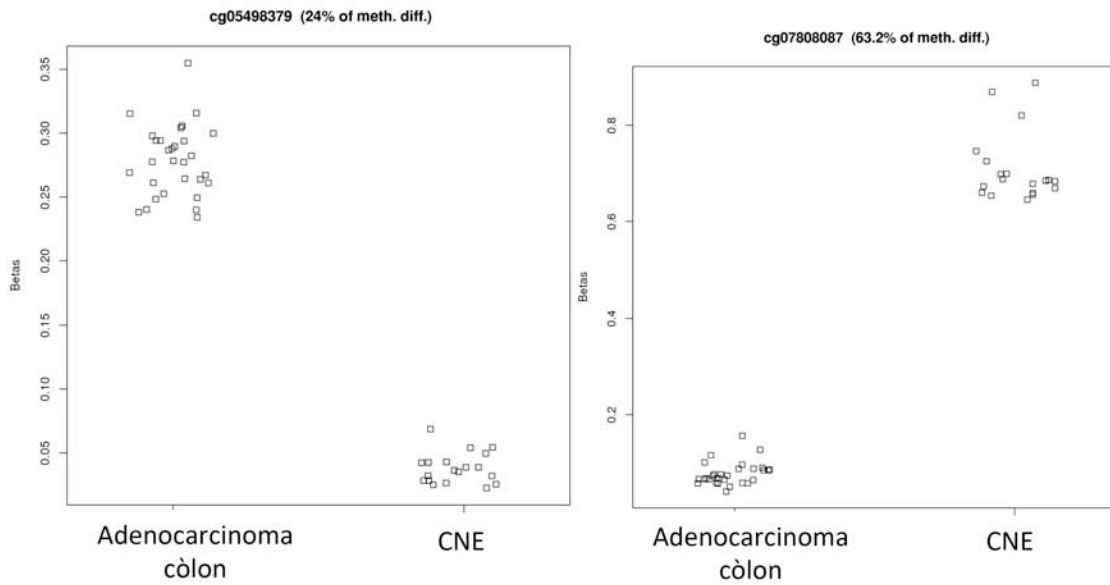
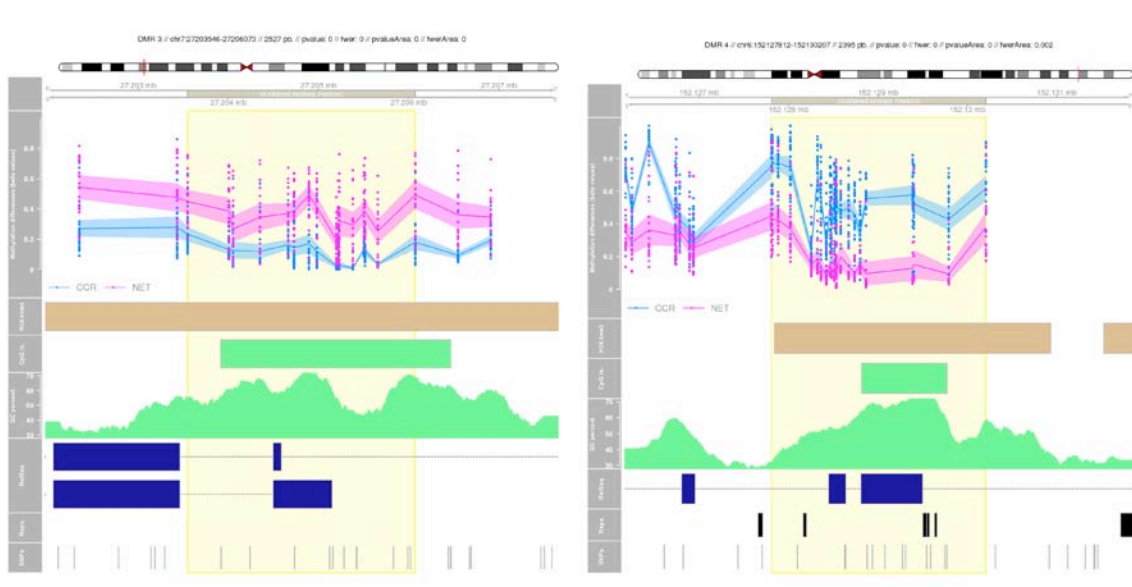


Figura 8. Regions amb diferents nivells de metil·lació comparant adenocarcinoma i CNE de còlon. Per identificar les regions amb metil·lació diferencial s'han creat clústers de CpGs amb separacions màximes de 800 parells de bases i agrupades per un perfil de metil·lació similar. La significació s'ha buscat corregint les diferències observades amb múltiples comparacions amb permutacions ($n=1000$) confirmant tant en nivell de metil·lació com la longitud de clúster per a descartar resultats a l'atzar.



12.3 Resultats de l'anàlisi de la inestabilitat de microsatèl·lits

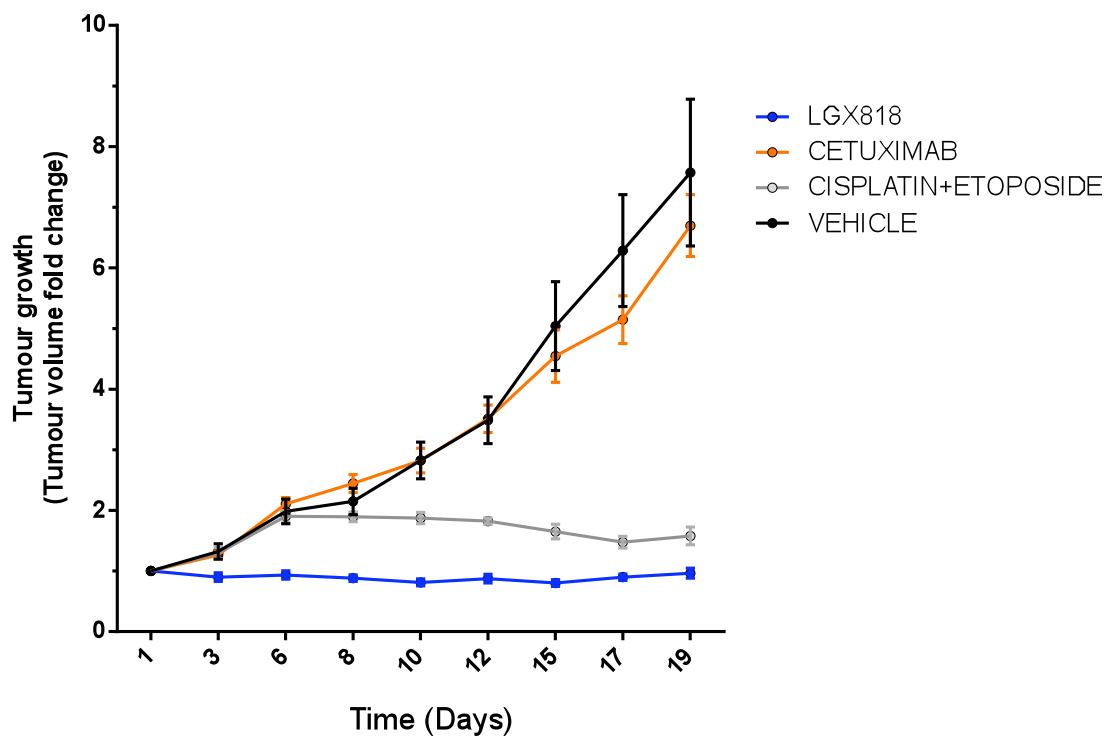
24 de les 25 mostres disponibles es van poder analitzar per a determinació de la inestabilitat de microsatèl·lits. En el 100% dels casos es va demostrar una preservació de l'expressió de les proteïnes reparadores del DNA: MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. Els resultats van ser coincidents tant per immunohistoquímica com per PCR.

12.4 Resultat de l'experiment amb PDX derivat de pacient amb CNE colònic

Els models de PDX es van confirmar histològicament que preservaven la morfologia de CNE de còlon igual que el pacient d'on provenien. El perfil mutacional obtingut per VHIOCard va demostrar les mateixes mutacions, preservant la mutació diana V600E en BRAF.

Com es pot observar en la figura 9, els PDX BRAF mutat V600E de CNE de còlon presenten una elevada sensibilitat al tractament amb inhibidor de BRAF LGX818, inclús superior a l'observada amb la combinació estàndard per a aquest tumor (cisplatí-etopòsid). L'inici de tractament amb l'inhibidor BRAF produeix una parada brusca del creixement tumoral perllongada en el temps.

Figura 9. Les cèl·lules tumorals derivades del CNE de còlon van ser injectades subcutàniament al ratolí NOD-SCID i tractades segons s'indica en la gràfica. Sis ratolins amb tumors en els dos flancs van ser tractats en cada grup. La gràfica representa el creixement tumoral calculat comparant el volum tumoral a cada punt concret del temps respecte el volum tumoral del primer dia de tractament.



13
Discussió

13. DISCUSSIÓ

Els CNE de primari colònic representen un tipus de NEN d'elevada agressivitat i mal pronòstic, amb escasses opcions terapèutiques. El tractament estàndard deriva per similitud histològica de les quimioteràpies emprades en el carcinoma de cèl·lula petita pulmonar, també tipificat com un CNE d'alt grau des del punt de vista histològic. Els resultats obtinguts amb la combinació de platí-etopòsid en CNE d'origen digestiu és significativament inferior a l'observada en carcinomes pulmonars de cèl·lula petita, suggerint diferències biològiques rellevant entre CNE que predisposen a una major o menor sensibilitat a la quimioteràpia.

Des del punt de vista molecular, els CNE de còlon estan poc estudiats, existint només petites sèries i reports de pocs pacients amb resultats heterogenis.

En la present tesi doctoral es presenten els resultats genòmics i epigenòmics més complets fins a l'actualitat en CNE de còlon, associat a experiments traslacional amb models murins derivats de pacients amb CNE de còlon, fins al moment no reportats en la literatura.

Des del punt de vista genòmic, s'observa un perfil mutacional molt similar a l'adenocarcinoma de còlon pel que fa al gens mutats implicats. En canvi, el percentatge de mutacions observada difereix significativament dels percentatges observats en l'adenocarcinoma de còlon⁴⁰. En l'adenocarcinoma de còlon i en funció de l'estat d'hipermutació, trobem com a gens més freqüentment alterats *ACVR2A*, *APC*, *TGFBR2*, *BRAF*, *MSH3* i *MSH6* en els

tumors hipermutats, i *APC*, *TP53*, *KRAS*, *TTN* i *PIK3CA* en els tumors no hipermutats, on les mutacions de *BRAF* són anecdòtiques. Considerant que les mutacions observades en cada mostra de CNE de còlon no suggereixen un estat hipermutacional, i la presència d'elevat percentatge de mutacions en els gens *APC*, *TP53* i *KRAS* podria suggerir una similitud genòmica amb l'adenocarcinoma de còlon, destaca l'elevat percentatge de mutacions observades en el gen *BRAF* (32%), comparat amb el 10% observat en l'adenocarcinoma de còlon sense inestabilitat de microsatèl·lits (perfil no hipermutat). D'altra banda, i intentant explicar l'elevat percentatge de mutacions observades en el gen *BRAF* suggestives al menys en l'adenocarcinoma de còlon d'un estat hipermutat associat a l'inestabilitat de microsatèl·lits (mutacions en el gen *BRAF* observades fins en el 47% dels casos de l'adenocarcinoma de còlon amb inestabilitat de microsatèl·lits, perfil hipermutat), vàrem comprovar l'estat dels microsatèl·lits en les mostres de CNE amb tècniques de PCR i immunohistoquímica, demostrant la preservació dels gens reparadors de l'ADN en totes les mostres de CNE analitzades (24 de 25). Amb aquests resultats es demostra que les mutacions observades en CNE, especialment l'elevat percentatge objectivat en el gen *BRAF*, provenen de la inestabilitat cromosòmica dels CNE, a diferència de l'adenocarcinoma de còlon, on majoritàriament les mutacions observades en el gen *BRAF* provenen de l'inestabilitat de microsatèl·lits.

Els resultats observats segons el perfil de metil·lació també demostren que estem davant de dues neoplàsies diferents. Els canvis epigenòmics observats en el CNE són significativament diferents dels observats en l'adenocarcinoma

de còlon, incloent regions amb major i menor grau de metil·lació. A diferència de les NENs G1/G2, el nivell general de metil·lació dels CNEs resulta inferior al de l'adenocarcinoma de còlon.

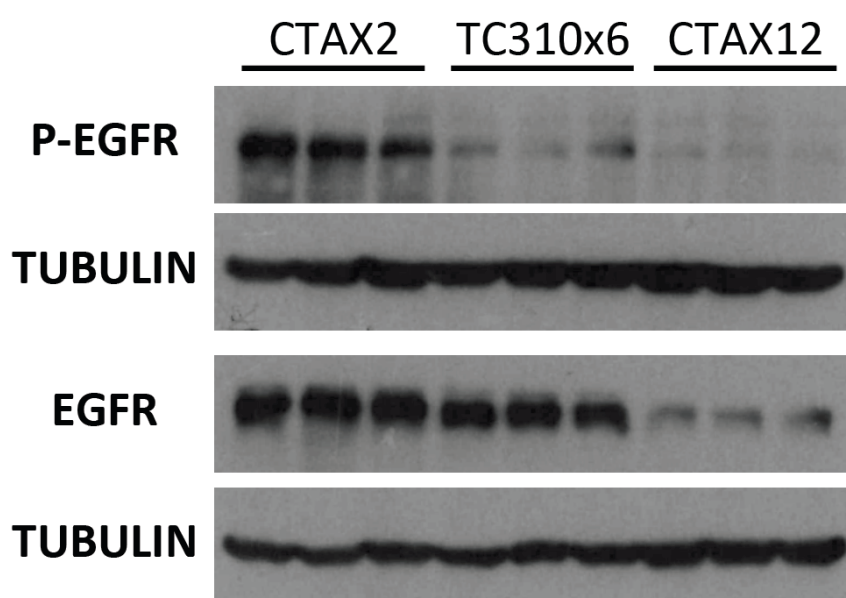
Donat l'elevat percentatge de mutacions observades en el gen BRAF en CNE de còlon, es va crear un model derivat de pacient amb la mateixa mutació per a testar l'activitat dels inhibidors de BRAF i comparar-ho amb el tractament estàndard actual (cisplatí-etopòsid) i amb inhibidors de EGFR. La resposta observada, amb una parada brusca del creixement dels tumors en el PDX, confirmen l'activitat preclínica dels inhibidors de BRAF en CNE de còlon portadors de mutació V600E en BRAF. L'activitat, superior a la de la quimioteràpia, obre una oportunitat de recerca clínica molt rellevant en una població de pacients amb limitades opcions de tractament. Recentment, s'han publicat els primers pacients afectes de CNE de còlon portadors de mutació V600E en BRAF i tractats amb inhibidors de la via de les MAPKs. Desafortunadament, l'elecció del tractament en aquests pacients s'ha basat en l'experiència prèvia en melanoma i adenocarcinoma de còlon, combinant inhibidors de BRAF amb inhibidors de MEK, esperant obtenir una millor resposta. Segons els resultats del present treball, tant el perfil mutacional en ADN com els canvis de metil·lació genòmica són significativament diferents de l'adenocarcinoma de còlon, per tant, no es poden assumir les mateixes expectatives de resposta als inhibidors de BRAF. Observant l'eficàcia en monoteràpia de l'inhibidor de BRAF en el model PDX, es pot suggerir que al menys a nivell preclínic la inhibició única de BRAF podria tenir un efecte superior que l'observat en l'adenocarcinoma de còlon. En aquest sentit, el perfil

de metil·lació de l'ADN tumoral en CNE difereix de forma significativa respecte a l'ADN tumoral de l'adenocarcinoma de còlon i s'observen diferències significatives en particular en el gen que codifica EGFR. La pèrdua de la retroalimentació negativa que exerceixen els productes finals de la via de senyalització de les MAPKs sobre EGFR és un dels mecanismes descrits que confereixen resistència als inhibidors de BRAF en l'adenocarcinoma de còlon⁴¹.

D'altra banda, hem objectivat mutacions en el gen *TP53* en el 84% dels casos, un percentatge significativament més elevat que en l'adenocarcinoma de còlon (53%) i de forma molt rellevant, les mutacions en el gen *TP53* s'han associat a les mutacions en el gen *BRAF* en el 87% dels casos, quan en l'adenocarcinoma de còlon són mútuament excloents, $p < 0.001$, a l'igual que les mutacions en el gen *KRAS*, concomitants amb *TP53* en el 85% dels casos de CNE de còlon i mútuament excloents en l'adenocarcinoma de còlon (www.cbioportal.org). L'elevat percentatge de mutacions observades en el gen *TP53* i aquestes concomitants amb les mutacions en oncogens *driver* com *BRAF* i *KRAS* destaca la més que probable rellevància que exerceixen les mutacions en el gen supressor tumoral *TP53* en la biologia del CNE de còlon. L'agressivitat i mal pronòstic associat al CNE de còlon comparat amb l'adenocarcinoma es podria explicar per les mutacions observades en *TP53* i la inestabilitat cromosòmica que generaria la pèrdua de funció de p53. Aquest fet ja s'ha en altres tumors de l'àrea endocrinològica i podria repetir-se en els CNEs de còlon⁴².

Les mutacions observades en el gen *KRAS* (56%) i *NRAS* (8%) resulten més similars a les observades en l'adenocarcinoma de còlon (43% i 9%, respectivament) podent hipotetitzar una aproximació terapèutica similar a l'actualment en marxa en població *RAS* mutada en càncer colorectal avançat, combinant la inhibició de MEK 1/2 amb quimioteràpia, amb altres teràpies dirigies contra la mateixa via metabòlica (inhibidors de BRAF o EGFR) o combinacions amb inhibidors de vies metabòliques paral·leles, com la via de PIK3CA-AKT-mTOR. Si es confirma la diferència en l'expressió de EGFR en CNE de còlon comparat amb l'adenocarcinoma de còlon com a biomarcador predictiu de resposta a inhibidors de BRAF en CNEs (dades inicials en figura 10), la mateixa explicació es podria observar amb els inhibidors de MEK 1/2 en CNEs, podent observar una resposta significativa amb la inhibició única d'aquesta proteïna en la població de CNEs *K/NRAS* mutats. La generació de models PDXs de CNEs portadors de mutacions en *K/NRAS* serà necessària per a demostrar a nivell traslacional l'eficàcia d'aquesta hipòtesi abans de testar el tractament en pacients afectes de CNEs *K/NRAS* mutats.

Figura 10. Determinació d'expressió de EGFR i p-EGFR en tres models de PDXs (CTAX2 i CT310x6 corresponents a adenocarcinoma de còlon i CTAX12 corresponent al model PDX de CNE utilitzat en els experiments del present treball de tesi doctoral). En el *western blot* s'observa la falta d'expressió tant de EGFR com de p-EGFR en el model PDX de CNE comparat amb els models d'adenocarcinoma.



14 **Conclusions**

14. CONCLUSIONS

1.- El perfil genòmic dels carcinomes neuroendocrins de primari colònic presenta més similituds amb les alteracions observades en l'adenocarcinoma de còlon que amb la resta de neoplàsies neuroendocrines del tracte digestiu.

2.- Tot i observar mutacions en gens típics de l'adenocarcinoma de còlon, la incidència d'aquestes mutacions és diferent en els carcinomes neuroendocrins de còlon.

3.- Destaca el percentatge de mutacions observades en el gen *BRAF* i l'associació amb un estat no hipermutacional i d'instabilitat cromosòmica, enlloc de la instabilitat de microsatèl·lits a la que s'associa la mutació V600E en *BRAF* observada en l'adenocarcinoma de còlon

4.- El perfil de metil·lació de l'ADN dels carcinomes neuroendocrins de primari colònic es significativament diferent a l'observat en adenocarcinomes de còlon, presentant una tendència a la menor metil·lació comparat amb l'adenocarcinoma.

5.- La creació de models murins derivats de pacients amb carcinoma neuroendocrí de primari colònic és viable, reproduïble i consistent amb el perfil molecular originari del pacient, i permet testar diferents tractaments en funció de les alteracions moleculars observades.

6.- La inhibició de *BRAF* en models PDXs de carcinoma neuroendocrí de primari colònic portadors de mutació V600E en *BRAF* ha demostrat una activitat significativament superior a la de la quimioteràpia estàndard i el bloqueig de *EGFR*, obrint una porta esperançadora a estudis dirigits en pacients.

15
Bibliografia

15. BIBLIOGRAFIA

1. Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid Tumors. *N Engl J Med.* 1999; 340(11): 858-68.
2. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncology.* 2008; 9(1): 61-72.
3. Dromain C, de Baere T, Lumbroso J, Caillet H, Laplanche A, Boige V, et al. Detection of liver metastases from endocrine tumors: a prospective comparison of somatostatin receptor scintigraphy, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol.* 2005; 23(1): 70-8.
4. Bosman F. WHO classification of tumours of the digestive system. IARC Press, Lyon, France. 2010.
5. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One Hundred Years After "Carcinoid": Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *J Clin Oncol.* 2008; 26(18): 3063-72.
6. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, Schoenmakers CH, Lindemans J, De Herder WW, et al. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(8): 2622-8.
7. Singh S, Law C. Chromogranin A: a sensitive biomarker for the detection and post-treatment monitoring of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Expert review of gastroenterology & hepatology.* 2012; 6(3): 313-34.

8. Janson ET, Holmberg L, Stridsberg M, Eriksson B, Theodorsson E, Wilander E, et al. Carcinoid tumors: analysis of prognostic factors and survival in 301 patients from a referral center. *Ann Oncol.* 1997; 8(7): 685-90.
9. Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, Baum RP, Fanti S, Gabriel M, et al. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging.* 2010; 37(10): 2004-10.
10. Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, Latich I, Modlin IM. The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer.* 2005; 104(11): 2292-309.
11. Perren A, Anlauf M, Komminoth P. Molecular profiles of gastroenteropancreatic endocrine tumors. *Virchows Arch.* 2007; 451 Suppl 1: S39-46.
12. Arnold CN, Sosnowski A, Blum HE. Analysis of molecular pathways in neuroendocrine cancers of the gastroenteropancreatic system. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1014: 218-9.
13. Cingarlini S, Bonomi M, Corbo V, Scarpa A, Tortora G. Profiling mTOR pathway in neuroendocrine tumors. *Target Oncol.* 2012; 7(3): 183-8.
14. Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, della Peruta M, et al. Pancreatic Endocrine Tumors: Expression Profiling Evidences a Role for AKT-mTOR Pathway. *J Clin Oncol.* 2010; 28(2): 245-55.
15. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science.* 2011; 331(6021): 1199-203.

16. Banck MS, Kanwar R, Kulkarni AA, Boora GK, Metge F, Kipp BR, et al. The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2013; 123(6): 2502-8.
17. Susini C, Buscail L. Rationale of the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann Oncol*. 2006; 17(12): 1733-42.
18. Rinke A, Muller 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*. 2009; 27(28): 4656-63.
19. Caplin ME, Pavel M, Cwikla JB, Phan AT, Raderer M, Sedlackova E, et al. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2014; 371(3): 224-33.
20. Yao JC, Guthrie K, Moran C, Strosberg JR, Kulke MH, Chan JA, et al. SWOG S0518: Phase III prospective randomized comparison of depot octreotide plus interferon alpha-2b versus depot octreotide plus bevacizumab (NSC #704865) in advanced, poor prognosis carcinoid patients (NCT00569127). *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 4004)
21. Moertel CG, Hanley JA, Johnson LA. Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 1980; 303(21): 1189-94.
22. Moertel CG, Hanley JA. Combination chemotherapy trials in metastatic carcinoid tumor and the malignant carcinoid syndrome. *Cancer Clin Trials*. 1979; 2(4): 327-34.

23. Garcia-Carbonero R, Capdevila J, Crespo-Herrero G, Díaz-Pérez JA, Martínez Del Prado MP, Alonso Orduña V, et al. Incidence, patterns of care and prognostic factors for outcome of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs): results from the National Cancer Registry of Spain (RGETNE). . *Ann Oncol.* 2010; 21(9): 1794-803.
24. Strosberg JR, Fine RL, Choi J, Nasir A, Coppola D, Chen TD, et al. First-Line Chemotherapy With Capecitabine and Temozolomide in Patients With Metastatic Pancreatic Endocrine Carcinomas. *Cancer.* 2011; 117(2): 268-75.
25. Sun W, Lipsitz S, Catalano P, Mailliard JA, Haller DG. Phase II/III Study of Doxorubicin With Fluorouracil Compared With Streptozocin With Fluorouracil or Dacarbazine in the Treatment of Advanced Carcinoid Tumors: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1281. *J Clin Oncol.* 2005; 23(22): 4897-904.
26. 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; 68(2): 227-32.
27. Raymond E, Dahan L, Raoul J-L, Bang Y-J, Borbath I, Lombard-Bohas C, et al. Sunitinib Malate for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med.* 2011; 364(6): 501-13.
28. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, et al. Everolimus for Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med.* 2011; 364(6): 514-23.
29. Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Horsch D, Winkler RE, et al. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of

advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2011; 378(9808): 2005-12.

30. 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*. 2016; 5;387(10022):968-77.

31. Sakurai M, Sandberg AA. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XI. Correlation of karyotypes with clinical features of acute myeloblastic leukemia. *Cancer*. 1976; 37(1): 285-99.

32. Falor WH, Ward RM. Prognosis in early carcinoma of the bladder based on chromosomal analysis. *J Urol*. 1978; 119(1): 44-8.

33. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(4): 286-98.

34. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008; 456(7218): 66-72.

35. Shah SP, Morin RD, Khattra J, Prentice L, Pugh T, Burleigh A, et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature*. 2009; 461(7265): 809-13.

36. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*. 2010; 463(7278): 191-6.

37. Pleasance ED, Stephens PJ, O'Meara S, McBride DJ, Meynert A, Jones D, et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*. 2010; 463(7278): 184-90.
38. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science*. 2002; 297(5578): 63-4.
39. Luo J, Emanuele MJ, Li D, Creighton CJ, Schlabach MR, Westbrook TF, et al. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell*. 2009; 137(5): 835-48.
40. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487(7407): 330-7.
41. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*. 2012; 483(7387): 100-3.
42. Capdevila J, Vivancos A, Matias-Guiu X, Iglesias C, Salva F, Serres X, et al. Genomic landscape of anaplastic thyroid cancer. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 6033). 2014.