



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Terapia antiangiogénica en cáncer colorrectal  
metastásico: identificación de biomarcadores**

**Antiangiogenic therapy in metastatic colorectal cancer:  
identification of biomarkers**

*Autora:* María José Ortiz Morales

*Directores:*

Enrique Aranda Aguilar

Antonio Rodríguez Ariza

Programa de Doctorado en Biomedicina

Línea de Nuevas Terapias en Cáncer: Oncología de Precisión

En Córdoba, a 9 de septiembre de dos mil veintidós

Córdoba, España

TITULO: *Terapia antiangiogénica en cáncer colorrectal metastásico:  
identificación de biomarcadores*

AUTOR: *María José Ortiz Morales*

---

© Edita: UCOPress. 2022  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



**TÍTULO DE LA TESIS:**

TERAPIA ANTIANGIOGÉNICA EN CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO:  
IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES.

**DOCTORANDA:** MARÍA JOSÉ ORTIZ MORALES

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

Prof. Dr. ENRIQUE ARANDA AGUILAR, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y Dr. ANTONIO RODRÍGUEZ ARIZA

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado “Terapia antiangiogénica en cáncer colorrectal metastásico: identificación de biomarcadores” ha sido realizado por D<sup>a</sup> MARÍA JOSÉ ORTIZ MORALES, bajo nuestra dirección, en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), dentro del grupo CG6 “Nuevas terapias en Cáncer”. Este trabajo ha conseguido un nivel científico de suficiente relevancia como para derivar en la publicación de un artículo en una revista internacional de impacto e incluida dentro del primer cuartil Q1 en su categoría titulado:

*Basal VEGF-A and ACE Plasma Levels of Metastatic Colorectal Cancer Patients Have Prognostic Value for First-Line Treatment with Chemotherapy Plus Bevacizumab. Cancers 2022, 14, 3054. doi.org/10.3390/cancers14133054.*

A nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 9 de septiembre de 2022

Firma de los directores

ARANDA AGUILAR  
ENRIQUE - 30424970H

Firmado digitalmente por  
ARANDA AGUILAR ENRIQUE  
- 30424970H  
Fecha: 2022.09.23 11:34:41  
+02'00'

Fdo.: Prof. Dr. Enrique Aranda Aguilar

RODRIGUEZ  
ARIZA ANTONIO  
- 30482007S

Firmado digitalmente por  
RODRIGUEZ ARIZA  
ANTONIO - 30482007S  
Fecha: 2022.09.23 11:35:06  
+02'00'

Fdo.: Dr. Antonio Rodríguez Ariza



*A mi familia*  
*Por los pacientes*



## **AGRADECIMIENTOS**

*Recordando el pasado para avanzar, viviendo el presente para sentir y mirando al futuro para soñar.*

Mis padres siempre me han hablado de la vida como un magnífico libro en blanco con capítulos por escribir encadenados entre sí, que comienzan y se consiguen, quedándonos con el aprendizaje de lo vivido. En estos momentos me encuentro culminando la cima de un propósito que inicié hace ya unos años y me siento profundamente agradecida de poder alcanzarlo rodeada de las personas que me han ayudado y apoyado para hacerlo realidad.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores el Prof. Dr. Enrique Aranda Aguilar y el Dr. Antonio Rodríguez Ariza, el haber creído en mí y permitirme poder realizar esta tesis doctoral.

Al Prof. Dr. Enrique Aranda Aguilar, por su calidad académica y humana, gracias por enseñarme los pilares del método científico, por su perseverancia e inestimable confianza en que lo lograría y demostrarme que detrás del esfuerzo se obtiene la recompensa merecida.

Al Dr. Antonio Rodríguez Ariza gracias por su profesionalidad, dedicación y disponibilidad, animándome y guiándome en el tortuoso e ilusionante camino de la investigación para finalmente poder darle forma a esta tesis.

Gracias a la Dra. María Auxiliadora Gómez España por su implicación, enseñanzas y compromiso y al Prof. Dr. Juan de la Haba Rodríguez, por su contagioso entusiasmo por la ciencia.

Gracias a todos mis compañeros del Servicio de Oncología Médica, por vuestra valiosa ayuda en mi formación, por ser unos grandes profesionales y por vuestro apoyo y cariño demostrado durante estos años compartidos. De forma muy especial, doy las gracias al

grupo de Digestivo por la implicación en la inclusión de pacientes. A mis residentes, agradezco vuestras apreciadas palabras de ánimo.

Gracias a la Universidad de Córdoba, al Hospital Universitario Reina Sofía, al Instituto Carlos III y al Instituto Maimonides de investigación Biomédica de Córdoba por vuestro fundamental soporte técnico y humano. A todo el equipo de investigación de “Nuevas terapias en Cáncer”, destacando la ayuda de Rafael Mena, por vuestra labor en el trabajo experimental y análisis de resultados.

A todos los pacientes, que han aceptado participar voluntariamente en la realización de este proyecto, gracias porque sin vosotros es imposible que la ciencia avance.

Gracias a mi familia por ser el pilar más importante de mi vida.

A mis padres, Jose María y Petronila, a quienes adoro, gracias por quererme tanto, por vuestro ejemplo, esfuerzo, enseñanza y dedicación en ayudarme a llegar a ser quien soy y conseguir mis propósitos. A mis hermanas, Inmaculada y Ana María, mis mejores amigas y confidentes, gracias por todo lo vivido y compartido juntas, el cariño, la complicidad y disponibilidad en todo momento.

A Juan Francisco, mi marido, a quien quiero y admiro profundamente, gracias por un día encontrarte en mi camino para iniciar uno juntos, gracias por tu amor ilimitado, paciencia, comprensión, apoyo y darme el tiempo invertido en conseguir este logro. Pero sobretodo, te doy las gracias por nuestros hijos, Juan y Marta, el capítulo del libro más maravilloso que me ha regalado la vida.



La investigación realizada en relación con esta tesis doctoral ha sido financiada por la Acción Estratégica en Salud (proyecto PI16/01271) y el Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer, CIBERONC (CB16/12/00349), del Instituto de Salud Carlos III, y por la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (proyecto AECC14/002).





## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>15</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>1. CÁNCER COLORRECTAL.....</b>	<b>25</b>
1.1. Epidemiología y factores de riesgo .....	25
1.2. Clínica, diagnóstico y estadificación.....	26
1.3. Carcinogénesis en el cáncer colorrectal.....	27
1.4. Biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer colorrectal.....	30
1.5. Tratamiento del cáncer colorrectal metastásico .....	35
<b>2. ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER .....</b>	<b>36</b>
2.1. VEGF y cáncer .....	37
2.2. Fármacos antiangiogénicos en cáncer colorrectal metastásico .....	39
2.3. VEGF-A y cáncer colorrectal .....	41
<b>3. ANGIOGÉNESIS Y SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA..</b>	<b>44</b>
3.1. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, angiogénesis y cáncer .....	46
3.2. Enzima convertidora de angiotensina y el cancer colorrectal .....	48
<b>4. ANGIOGÉNESIS Y GALECTINAS .....</b>	<b>50</b>
4.1. Galectina-1, -3 y -9 en cáncer colorrectal.....	52
<b>5. ANGIOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL .....</b>	<b>54</b>
5.1. Respuesta inmune innata.....	55
5.2. Respuesta inmune adaptativa .....	57
<b>6. BIOMARCADORES Y BEVACIZUMAB. ....</b>	<b>58</b>
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>63</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>67</b>
1. OBJETIVO PRINCIPAL .....	69
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	69
<b>V. POBLACIÓN, DISEÑO Y METODOLOGÍA .....</b>	<b>71</b>
1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y DIAGRAMA DE FLUJO .....	73
2. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	74
3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES .....	75

4. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES.....	78
5. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y SEPARACIÓN DE PLASMA .....	79
6. ANÁLISIS DE MARCADORES CIRCULANTES EN PLASMA .....	79
7. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA INMUNE EN LOS TUMORES.....	80
8. VARIABLE PRINCIPAL .....	81
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	81
10. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	82
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES. ....	85
2. ASOCIACIÓN ENTRE SUPERVIVENCIA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO- PATOLÓGICAS.....	89
3. SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LOS TERCILES DE VEGF-A Y ECA .....	91
4. SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LOS TERCILES DE GALECTINAS-1, -3 Y -9.....	93
5. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN INCLUYENDO TERCILES DE VEGF-A Y ECA .....	95
6. GRUPOS PRONÓSTICO DE RIESGO EN FUNCIÓN DE LOS TERCILES DE VEGF-A Y ECA. ....	97
7. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE GRUPOS PRONÓSTICOS.....	98
8. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN FUNCIÓN DE LOS GRUPOS PRONÓSTICOS DE VEGFA y ECA. ....	99
9. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADA CON LA RESPUESTA INMUNE.....	100
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>105</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>IX. ABREVIATURAS.....</b>	<b>125</b>

<b>X. ANEXO I .....</b>	<b>131</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>137</b>
<b>XII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....</b>	<b>169</b>



## ***I. RESUMEN***





**ANTECEDENTES:** El cáncer colorrectal (CCR) a nivel mundial es el tercer tumor en incidencia y el segundo en mortalidad. A pesar de los importantes avances en el diagnóstico de los pacientes, el 20-25% presentarán enfermedad metastásica al diagnóstico y un 50% la desarrollará a lo largo de su evolución. El cáncer colorrectal metastásico (CCRm) es un complejo proceso tumoral heterogéneo en el que el desarrollo angiogénico y la vía molecular RAS están notablemente involucrados. En la actualidad, de los tratamientos dirigidos disponibles para el tratamiento del CCRm, la terapia antiangiogénica es la única que no dispone de biomarcadores validados en la práctica clínica que nos permitan identificar el grupo de pacientes que más se pueda beneficiar. En la era de la oncología de la precisión, la identificación de nuevos biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento antiangiogénico en CCRm representaría un importante avance en el manejo terapéutico de nuestros pacientes.

**OBJETIVO:** El objetivo principal fue evaluar el valor pronóstico y predictivo de los niveles plasmáticos basales y niveles de expresión en tejido tumoral de posibles biomarcadores implicados en la regulación del proceso de angiogénesis, sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y el perfil de respuesta inmune antitumoral en pacientes con CCRm que reciben tratamiento antiangiogénico con bevacizumab asociado a la quimioterapia.

**POBLACIÓN, DISEÑO Y METODOLOGÍA:** Se seleccionaron prospectivamente 73 pacientes diagnosticados de CCRm entre marzo de 2017 y diciembre de 2020 en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Reina Sofía de Córdoba que cumplían los criterios de inclusión, antes de iniciar el tratamiento estándar de primera línea que incluía bevacizumab. La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 19 meses (IC 95%: 17,2-21,3 meses). Se realizó el análisis de la supervivencia libre de progresión (SLP) y

la supervivencia global (SG). Los diferentes análisis en plasma de VEGF-A (factor de crecimiento del endotelio vascular), ACE (enzima convertidora de angiotensina), galectina-1, galectina-3 y galectina-9 se realizaron mediante kits ELISA. La clasificación y el análisis estadístico de los pacientes se estableció según los valores de los terciles (T1, T2, T3). Así mismo, del total de la población incluida en el estudio, se analizó en la muestra del tumor primario de 35 pacientes un panel de expresión génica relacionada con la respuesta inmune antitumoral.

**RESULTADOS:** Se analizaron 73 pacientes (mediana de edad de 62 años, 60% hombres). La histología más frecuente fue el adenocarcinoma (87,7%), y el 64,4% tenían una localización derecha del tumor primario. Dentro de las características moleculares, 59 (80,8%) pacientes tenían RAS mutado y 65 (89%) tenían microsatélites estables. Al final del estudio, 62 (84,9%) pacientes habían progresado a la primera línea y 48 (65,8%) pacientes habían fallecido. Los niveles plasmáticos más altos de VEGF-A se asociaron significativamente con peores tasas de supervivencia SG (T1: 28,5 vs T2: 22,6 vs T3: 18,3 meses;  $p=0,016$ ) y SLP (T1: 14,1 vs T2: 9,1 vs T3: 9,7 meses;  $p=0,033$ ). Por otro lado, los niveles plasmáticos altos de ECA se asociaron con mejores tasas de SG (T3: 26,3 vs T2: 23,3 vs T1: 18,1 meses;  $p=0,053$ ). Por último, la combinación de los niveles circulantes de VEGF-A y ECA permite clasificar a los pacientes con CCRm como alto, intermedio o bajo riesgo de mortalidad, antes de recibir tratamiento con bevacizumab SG (16,6 meses (IC95% 13,2-20,0) vs 29,8 meses (IC95% 21,7-37,9),  $p=0,007$ ). No se encontraron diferencias significativas en SG ni SLP relacionada con la expresión de galectina-1, galectina-3 y galectina-9. Finalmente, el análisis de la expresión génica inmune antitumoral permitió identificar un perfil de expresión inmune diferencial entre aquellos pacientes que presentaron una SLP  $\geq$  o  $<$  9 meses en tratamiento con bevacizumab asociado a la quimioterapia, sin alcanzar la significación estadística tras realizar el ajuste por FDR (10%).

**CONCLUSIÓN:** En pacientes con CCRm los niveles plasmáticos basales de VEGF-A y ECA podrían ser biomarcadores útiles para la selección de pacientes para reciban terapia antiangiogénica asociada a quimioterapia. Además, la asociación de estos dos biomarcadores podrían ser de gran utilidad pronóstica permitiendo estratificar a los pacientes en alto y bajo riesgo de mortalidad previamente al inicio de la terapia. Estos resultados confirman la estrecha asociación entre el sistema renina-angiotensina, el proceso de angiogénesis y la respuesta a la terapia antiangiogénica en CCRm. Consideramos de gran interés continuar con nuestra línea de investigación proporcionando nuevos estudios que amplíen el tamaño muestral y validaciones externas que permitan consolidar la aplicabilidad clínica de estos biomarcadores en los pacientes con CCRm.

## **SUMMARY**

**BACKGROUND:** Colorectal cancer (CRC) is the third tumor in terms of incidence and the second in terms of mortality worldwide. Despite the important advances in diagnosis, 20-25% of patients will present with metastatic disease at diagnosis and 50% will develop metastatic lesions during the course of the disease. Metastatic colorectal cancer (mCRC) is a complex heterogeneous tumor process in which the angiogenic process and the RAS molecular pathway are particularly involved. Currently, antiangiogenic therapy is the only targeted treatment available for the treatment of mCRC, which does not have validated biomarkers in clinical practice that will allow us to identify those patients that may benefit the most. In the era of precision oncology, the identification of new prognostic and predictive biomarkers of response to antiangiogenic treatment in mCRC would represent an important advance in the therapeutic management of our patients.

**OBJECTIVE:** The main objective was to evaluate the prognostic and predictive value of basal plasma levels and expression levels in tumor tissue of potential biomarkers involved in the regulation of the angiogenesis process, the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), and the antitumor immune profile in patients with mCRC receiving antiangiogenic treatment with bevacizumab associated with chemotherapy.

**POPULATION, DESIGN AND METHODOLOGY:** 73 patients diagnosed with mCRC between March 2017 and December 2020 in the Medical Oncology Service of the Reina Sofía Hospital in Córdoba who met the inclusion criteria were prospectively selected, before receiving standard first-line treatment with bevacizumab. The median follow-up was 19 months (95% CI: 17.2-21.3 months) and analyses of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were performed. The plasma levels of VEGF-A (vascular endothelial growth factor), ACE (angiotensin-converting enzyme), galectin-1, galectin-3, and galectin-9 were determined using ELISA kits. The classification and statistical

analysis of the patients was established according to tertiles (T1, T2, T3) values. Besides, from the total population included in the study, a gene expression panel related to the antitumor immune response was analyzed in the primary tumor sample of 35 patients.

**RESULTS:** 73 patients (median age 62 years, 60% men) were analyzed. The most frequent histology was adenocarcinoma (87.7%), and 64.4% had a right location of the primary tumor. Within the molecular characteristics, 59 (80.8%) patients had mutated RAS and 65 (89%) had stable microsatellites. At the end of the study, 62 (84.9%) patients had progressed to first line of treatment and 48 (65.8%) patients had died. Higher plasma VEGF-A levels were significantly associated with worse OS (T1: 28.5 vs T2: 22.6 vs T3: 18.3 months;  $p=0.016$ ) and PFS (T1: 14.1 vs T2: 9.1 vs T3: 9.7 months,  $p=0.033$ ) survival rates. On the other hand, high ACE plasma levels were associated with better OS rates (T3: 26.3 vs T2: 23.3 vs T1: 18.1 months;  $p=0.053$ ). Finally, the combination of circulating VEGF-A and ACE efficiently classified mCRC patients into high, intermediate or low mortality risk groups, before receiving treatment with bevacizumab SG (16.6 months (IC95% 13.2-20.0) vs 29.8 months (IC95% 21.7-37.9),  $p= 0.007$ ). No significant differences were found in OS or PFS related to the expression of galectin-1, galectin-3 and galectin-9. Finally, the analysis of the antitumor immune gene expression allowed us to identify a differential immune expression profile among those patients who presented a PFS or <9 months in treatment with bevacizumab associated with chemotherapy, without reaching statistical significance after adjusting for FDR ( 10%).

**CONCLUSION:** In mCRC patients, basal plasma levels of VEGF-A and ACE could be useful biomarkers for the selection of patients to receive antiangiogenic therapy associated with chemotherapy. In addition, the association of these two biomarkers could be of great prognostic utility, allowing patients to be stratified into high and low risk

of mortality prior to starting therapy. These results confirm the close association between the renin-angiotensin system, the angiogenesis process and the response to antiangiogenic therapy in mCRC. We consider of great interest to continue with our line of research by providing new studies with larger sample sizes and external validations to confirm the clinical applicability of these biomarkers in patients with mCRC.

## ***II. INTRODUCCIÓN***





## 1. CÁNCER COLORRECTAL

### 1.1. Epidemiología y factores de riesgo

En la actualidad, el cáncer supone un importante desafío de salud pública a nivel mundial, siendo una de las principales causas de morbilidad. En las últimas décadas, el número absoluto de tumores diagnosticados ha aumentado a causa del incremento poblacional, el envejecimiento, la exposición a factores de riesgo y, en determinados tumores, a la incorporación de los programas de detección precoz mediante métodos de cribado.

A nivel mundial, las estimaciones dentro del proyecto GLOBOCAN confirman que en el año 2020 se diagnosticaron 19,3 millones de nuevos casos y se produjeron casi 10 millones de muertes. La tendencia esperada es que estas estimaciones de incidencia en el año 2040 alcancen hasta los 30,2 millones de nuevos casos (1).

En España, según los cálculos actualizados de REDECAN en el año 2022 (2), la incidencia estimada es de 280 100 nuevos casos, de los que 160 066 casos serán hombres y 120 035 mujeres. La cifra prevista para 2040 alcanzará aproximadamente los 341 000 nuevos casos. En 2020, el cáncer fue la segunda causa de muerte y se estima que la mortalidad por cáncer se incrementará de 113 000 casos en 2020 a más de 160 000 en 2040.

El cáncer colorrectal (CCR), a nivel mundial ocupa el tercer lugar en términos de incidencia, con estimaciones para 2022 de 1 931 590 casos (10,7%) y el segundo en mortalidad, con 935 173 fallecimientos (9,4%) en 2020 (1). En España, se estima que en el año 2022 será el tumor más frecuentemente diagnosticado con 43 370 nuevos casos, seguido del cáncer de mama (34 750) y pulmón (30 948). La estimación de la prevalencia a los 5 años en 2020 es de 191 884 casos, de los cuales 84 760 serán

hombres y 148 205 mujeres. Las cifras de mortalidad, en 2020 alcanzaron los 11 131 casos, con un incremento previsto hasta los 17 735 para el año 2040 (2).

La mayoría de los casos de CCR son esporádicos (75-80%), aproximadamente un 20% presentan agregación familiar y únicamente un 5-7% se deben a mutaciones genéticas causantes de enfermedades hereditarias conocidas, como es el síndrome de Lynch y la poliposis adenomatosa familiar (PAF), entre otras (3). Dentro de los factores de riesgo, en el CCR esporádico la edad es el más importante, con un crecimiento exponencial. A éste se añaden otros factores ambientales, algunos de ellos modificables, como son la obesidad, el sedentarismo, la dieta rica en carnes rojas y/o procesados y pobre en fibra, la presencia de enfermedad inflamatoria intestinal, el alcohol y el tabaco (4).

## **1.2. Clínica, diagnóstico y estadificación**

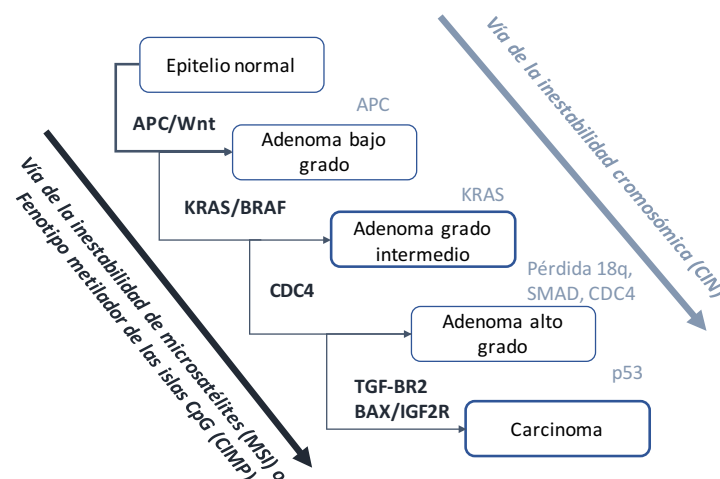
Aproximadamente el 30-40% de los tumores primarios aparecen en el lado derecho del intestino grueso, donde el diagnóstico suele ser más tardío por presentar una sintomatología más inespecífica (5). La edad media de aparición es de 68 años, diagnosticándose solo un 12% en pacientes menores de 50 años. No obstante, la incidencia en este grupo está en aumento, probablemente debido a los cambios en el estilo de vida (6). El estadio tumoral es el factor pronóstico más importante en el CCR. Al diagnóstico, el 49% de los pacientes presentan estadios iniciales, el 28% avanzados y el 23% serán metastásicos (7). Actualmente, el sistema de estadificación convencional es el TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC), con su versión más actualizada en la octava edición (8). **[Tabla 1 del Anexo I]**

El tratamiento de elección en tumores localizados es la resección quirúrgica completa con márgenes libres y la indicación de tratamiento adyuvante se establece de acuerdo con el estadio y factores pronósticos asociados (9). La probabilidad de desarrollar metástasis es inferior al 10% en el estadio I, alcanzando el 25-50% en los pacientes con

estadio III. Previo a establecer la estrategia terapéutica, es necesaria la confirmación histológica, siendo el adenocarcinoma la histología más frecuente. Es preciso realizar un análisis de sangre completo y la determinación del antígeno carcinoembrionario (CEA). El estudio de extensión se realiza mediante tomografía axial computarizada (TAC) de tórax, abdomen y pelvis. Previo a la resección quirúrgica o ante duda diagnóstica es necesario completarlo con resonancia magnética (RM) y/o tomografía por emisión de positrones (PET-TAC) (10).

### 1.3. Carcinogénesis en el cáncer colorrectal

El CCR es una enfermedad heterogénea, producida por numerosas alteraciones, tanto genéticas como epigenéticas, que desregulan las vías de señalización involucradas en la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis celular. Existen tres vías principales de carcinogénesis que dan lugar a la inestabilidad genética y participan en el desarrollo del CCR, que desarrollaremos a continuación. **[Figura 1]**



**Figura 1.** Modelo genético de múltiples vías de carcinogénesis para la secuencia del carcinoma colorrectal.

Adaptado de Malki y cols., 2020 (11).

### *1.3.1. Inestabilidad de microsatélites (microsatellite instability; MSI)*

Esta vía es responsable de aproximadamente 15-20% de todos los casos de CCR esporádicos y del 70-80% de los síndromes hereditarios no polipósicos. Se caracteriza por la inactivación de genes reparadores del ADN, produciendo una acumulación de errores de inserción o eliminación en secuencias cortas repetidas de ADN conocidas como microsatélites.

Los tumores esporádicos con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) se ven afectados por un estado de hipermetilación del promotor del gen MLH1 que produce su inactivación, o por mutaciones en el gen BRAF (12), mientras que la forma hereditaria es el denominado síndrome de Lynch, que supone el 3-5% de todos los casos de CCR y está causado por mutaciones en la línea germinal de los genes de reparación MLH1, PMS2, MSH6 o MSH2 (13). Estos tumores presentan características clínico-patológicas específicas, como son una localización preferentemente en colon proximal, histología mucinosa, pobremente diferenciados y presencia de células T que infiltran el tumor (14).

### *1.3.2. Inestabilidad cromosómica o vía supresora (chromosomal instability; CIN)*

Es la vía más frecuente, responsable del 70-80% de los CCR esporádicos, aunque también la presentan algunos síndromes hereditarios. Los mecanismos que subyacen a esta vía incluyen alteraciones en la segregación cromosómica, disfunción de los telómeros y respuesta al daño del ADN, afectando a genes que están implicados en el mantenimiento de la función celular. La vía CIN se caracteriza por la activación de oncogenes (KRAS y BRAF), la inactivación de genes supresores de tumores (APC y TP53), y una pérdida de heterocigosidad para el brazo largo del cromosoma 18, promoviendo así la tumorigénesis del CCR (11). La pérdida de función de APC da lugar a una activación de la vía de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, evento que se considera promotor en el desarrollo del CCR; mientras que las mutaciones en KRAS y PI3K conducen a una activación constitutiva de las MAP quinasas, amplificando así la

proliferación celular. Por último, las mutaciones con pérdida de función en TP53, dan lugar a una pérdida de control del ciclo celular (15). Los tumores CIN suelen estar localizados en el colon izquierdo, son bien diferenciados, con una baja frecuencia de tumores mucinosos y escasa infiltración linfocitaria.

### *1.3.3. Vía mutadora y fenotipo metilador de las islas CpG (CpG island methylator phenotype; CIMP o vía serrada)*

En este caso el CCR se desarrolla a través de una vía de inestabilidad epigenética que se caracteriza por una amplia hipermetilación en islas CpG de secuencias promotoras, provocando la inactivación de varios genes supresores de tumores u otros genes relacionados con el tumor (16). Se distinguen tres fenotipos metiladores: ausencia de metilación, baja metilación y alta metilación. La lesión precursora suele ser el pólipo serrado en vez del adenoma característico de las otras vías. La presencia de la mutación de BRAF es temprana y está presente en los tumores con alta metilación, mientras que la presencia de mutación KRAS se observa en aquellos con baja metilación.

De manera importante, hace unos años un consorcio internacional (International CRC Subtyping Consortium) elaboró una única clasificación molecular basada en firmas de expresión génica, cuyos subtipos integran las distintas vías de carcinogénesis colorrectal (17). Este estudio identificó cuatro subtipos moleculares, cada uno con características diferenciadoras: subtipos CMS1 (MSI-inmune), CMS2 (canónico), CMS3 (metabólico) y CMS4 (mesenquimal). El subtipo CMS1 (14 % de los casos de CCR) se caracteriza por una hipermutación y un estado elevado de MSI debido a deficiencias en los genes MLH1, MSH2, PMS2 y MSH6, hipermetilación (CIMP) y una intensa activación inmunitaria. El subtipo CMS2 (37%) presenta CIN elevado con un gran número de alteraciones en el número de copias somáticas (SCNA), así como activación de las vías Wnt/ $\beta$ -catenina y MYC, y un aumento de la expresión de oncogenes como HER2, IGF-2 e IRS. El subtipo CMS3 (13%) muestra un bajo nivel de activación inmune y capacidad

de reprogramación metabólica, con mutaciones en KRAS, y baja CIMP. Y finalmente, el subtipo CMS4 representa el 23% de los casos en etapas tempranas y se caracteriza por la activación de la vía de transición epitelio-mesenquimal, así como por la sobreexpresión de proteínas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis. Este subtipo también muestra una fuerte infiltración de células estromales, especialmente fibroblastos, y una peor supervivencia global y libre de recaída (17, 18). A día de hoy esta clasificación del CCR en subtipos CMS tiene valor pronóstico, pero su uso no es aplicable en la práctica clínica asistencial.

#### **1.4. Biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer colorrectal**

El conocimiento de las características moleculares y biológicas del CCR han proporcionado grandes avances en la comprensión de su patogénesis (19). Esto ha permitido el desarrollo de biomarcadores moleculares que ayuden al manejo de los pacientes en relación al diagnóstico, la elección del tratamiento, el seguimiento de la enfermedad y la respuesta a la terapia.

##### *1.4.1 Biomarcadores pronósticos*

El CCR es una entidad con un pronóstico variable en función de distintos factores clínicos, patológicos y moleculares. La dificultad reside en que en ocasiones no disponemos de un consenso claro sobre cuales son válidos, factibles y consistentes.

El principal factor pronóstico es el estadio (20), que depende del tamaño del tumor, de la presencia de metástasis ganglionares y en otros órganos (**Tabla 1 del Anexo I**). La SG a los 5 años es del 70-85%, 60-75%, 40-60% y menos del 20% para los estadios I, II, III y IV respectivamente (21).

Dentro de los factores pronósticos clínicos y bioquímicos, previos al conocimiento de la biología molecular, destacan: edad (peor pronóstico en jóvenes), fosfatasa alcalina, recuento de leucocitos, ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*, una escala que mide el estado funcional de los pacientes) (22), lactato deshidrogenasa (LDH), número de localizaciones metastásicas y más recientemente, la ratio neutrófilo-linfocito (NLR) (23). Además, disponemos de factores histopatológicos con valor pronóstico, útiles en el estadio localizado, como el tipo histológico, el grado de diferenciación, la afectación ganglionar, la presencia de células en anillo de sello, la invasión linfovascular o perineural y con la incorporación en los últimos años de la valoración del *budding tumoral* (24).

La localización del tumor primario en el CCR también es un factor que influye sustancialmente en el pronóstico. Según el metaanálisis realizado por Petrelli y cols. en 2017, en los pacientes con un tumor de localización izquierda se observa una mayor SG respecto a la localización derecha, con independencia del año del estudio, raza, estadio al diagnóstico, número de pacientes incluidos y si habían recibido quimioterapia adyuvante (25).

En los últimos años, se han incorporado nuevos biomarcadores pronósticos identificados en tejido tumoral y plasmáticos que nos permiten un mejor conocimiento y manejo terapéutico. La **Tabla 1** resume las características principales de estos biomarcadores pronósticos en CCR (26).

**Tabla 1.** Biomarcadores pronósticos tisulares y circulantes en CCR.

	<b>BIOMARCADORES PRONÓSTICOS</b>	Ref.
<b>TISULARES</b>		
<b>BRAF</b>	Frecuencia: 8-12%	(27)
	La mutación de BRAF V600E se asocia a un peor pronóstico, con menor SLP y SG.	(28)
<b>MSI</b>	Frecuencia: CCR localizados 15%; CCRm 5%	(29)
	Los tumores con MSI alto tienen mejor pronóstico que los tumores con MSI bajo o MSS. La influencia pronóstica es menos clara en CCRm.	(30)
<b>CIMP</b>	Frecuencia 10-20%	(31)
	El papel pronóstico no está claro. La mayoría de los estudios informaron que los pacientes con CCR CIMP+/CIMP-alto mostraban un peor pronóstico.	(32)
<b>APC</b>	Frecuencia: 80-85%	
	Los pacientes con la mutación de la APC y un nivel elevado de miR-21 presentan una SG más corta.	(33, 34)
<b>p53</b>	Frecuencia: 50-70%	(35)
	Resultados contradictorios sobre su papel pronóstico. Algunos estudios informan de que la mutación/sobreexpresión de p53 se asocia con tasas más bajas de SLE y de SG.	(36)
<b>SMAD4</b>	Frecuencia: 30-40%	(37)
	La pérdida de SMAD4 se asoció con una SLE y SG más corta.	(38)
<b>CIRCULANTES</b>		
<b>CEA</b>	Único marcador recomendado en el seguimiento de pacientes con CCR estadio II y III tras cirugía.	(39)
	El nivel preoperatorio está asociado significativamente con el pronóstico en pacientes con CCR con metástasis en el hígado.	(40)
<b>NLR</b>	Los pacientes con un NLR elevado se asociaron significativamente con una SG y una SLP más cortas después del tratamiento. Los pacientes con un NLR pretratamiento <5 tenían una mayor SG y SLE a 5 años. Un NLR pretratamiento elevado se relacionó significativamente con una SG y una SLE más cortos en pacientes con metástasis hepáticas.	(41)
		(42)
<b>cfDNA</b>		(43)
	Mayores concentraciones de cfDNA presentan un mayor riesgo de recidiva y una menor SG en pacientes intervenidos de CCR.	(44, 45)

*CIMP: Fenotipo metilador en islas CpG. SG: supervivencia global. SLE: supervivencia libre de enfermedad. CCR: cáncer colorrectal. CCRm: cáncer colorrectal metastásico. NRL: ratio neutrófilo-linfocito. cfDNA: circulating-free DNA (DNA libre circulante). MSS microsatélites estables. MSI: microsatélites inestables. PAF: poliposis adenomatosa familiar.*



#### 1.4.2. Biomarcadores predictivos

El primer biomarcador predictivo de resistencia a terapia dirigida contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), validado y aceptado en el CCRm fue la presencia de mutación en los oncogenes RAS. (46) Este incluye las mutaciones en los genes KRAS y NRAS (codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de los exones 2, 3 y 4). (47) Este hallazgo permitió seleccionar a aquellos pacientes con tumores sin mutaciones en estos genes como la población con mayor beneficio de respuesta a fármacos anti-EGFR (panitumumab y cetuximab).

Pero no solo disponemos de marcadores predictivos de respuesta o indicación de una terapia dirigida, sino que también algunos son predictivos de toxicidad, evitando efectos secundarios indeseables. La **Tabla 2** resume las características de los principales biomarcadores predictivos con mayor interés en CCR (26).

**Tabla 2.** Biomarcadores predictivos tisulares y circulantes en CCR.

	<b>BIOMARCADORES PREDICTIVOS</b>	Ref.
<b>TISULARES</b>		
<b>KRAS/NRAS</b>	Frecuencia: KRAS 40%; NRAS 3-5% Las mutaciones de RAS son factor predictivo negativo de la respuesta a tratamiento anti-EGFR.	(48)
<b>MSI</b>	Frecuencia: localizados 15%; metastásicos 5% Factor predictivo de respuesta de tratamiento con inmunoterapia en CCRm.	(49)
<b>BRAF</b>	Frecuencia: 8-12% Mutación BRAFV600E es un marcador predictivo de beneficio del tratamiento con inhibidor de BRAF y antiEGFR.	(50)
<b>PIK3CA</b>	Frecuencia: 10-18 % Los resultados son contradictorios sobre si la mutación de PIK3CA se asocia a una peor SLP y SG en los pacientes con CCR KRAS wt y resistencia a la terapia antiEGFR.	(51)
<b>HER2</b>	Frecuencia: 2-6%. Triple WT 13% Posible marcador predictor negativo de terapia antiEGFR y positivo de respuesta a la terapia antiHER2.	(52) (53)
<b>NTRK</b>	Frecuencia: 0,5-1%, alcanza 4% en MSI-H Factor predictivo de respuesta a terapia con inhibidores TRK en tumor agnóstico.	(54)
<b>CIRCULANTES</b>		
<b>DPyD</b>	Frecuencia: deficiencia relativa (3-5%) y completa (0,1%) Es marcador predictivo de toxicidad a 5FU.	(55)
<b>UGT1A1</b>	El alelo *28 está asociado a mayor toxicidad digestiva y medular con irinotecan.	(56)

CCR: cáncer colorrectal; CCRm: cáncer colorrectal metastático; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; NTRK: proteína de tirosina quinasa transformadora; DPyD: enzima dihidropirimidina deshidrogenasa; UGT1A1: uridina difosfato glucuronosiltransferasa; 5FU: 5-fluorouracilo; WT: wild-type.

## 1.5. Tratamiento del cáncer colorrectal metastásico

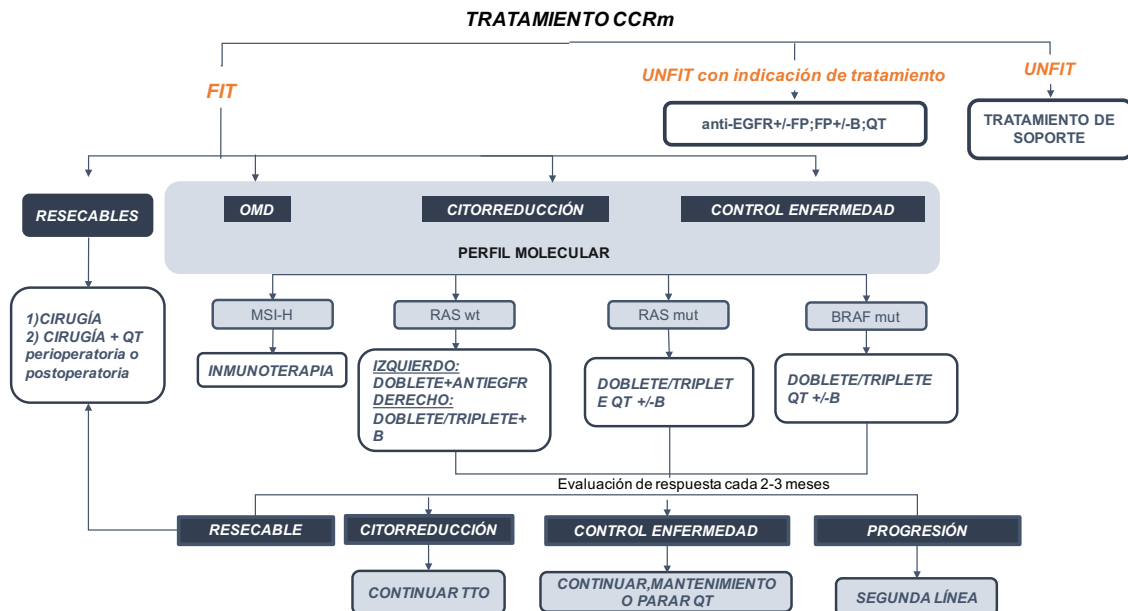
Aproximadamente el 25% de los pacientes con CCR se presentarán al diagnóstico como enfermedad metastásica y hasta el 50% la desarrollará en el curso de su enfermedad. El conocimiento de la biología molecular del CCRm junto con la identificación de biomarcadores ha supuesto un gran avance en el desarrollo de nuevos fármacos, permitiendo la mejor selección de pacientes, logrando adaptar el tratamiento y mejorar su SG hasta superar medianas de 30 meses (57).

### 1.5.1 Algoritmo de tratamiento de CCRm

El manejo de los pacientes con CCRm debe realizarse dentro de un enfoque multidisciplinar para establecer la mejor estrategia terapéutica. El objetivo es prolongar la supervivencia, mejorar la calidad de vida, detener la progresión de la enfermedad y en los casos donde es posible, llegar a la curación combinando modalidades de tratamiento (58).

Existen numerosos fármacos activos en el tratamiento de la enfermedad avanzada en CCRm: 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, raltitrexed, irinotecan, oxaliplatino, trifluridina/tipiracilo hidrocloreto, fármacos biológicos dirigidos al VEGF, como bevacizumab y aflibercept, anticuerpos dirigidos al EGFR únicamente en población RAS WT, como cetuximab o panitumumab o dirigidos a múltiples quinasas (VEGFR, PDGFR, FGFR, TIE2, KIT, RET, RAF) como regorafenib. A esto se añade la incorporación en los últimos años de la inmunoterapia en pacientes con MSI-H, el doblete con encorafenib y cetuximab en pacientes que presentan mutación BRAF<sup>V600E</sup> y otras terapias dirigidas contra dianas moleculares como HER2 y NTRK, entre otras.

A continuación, mostramos un algoritmo adaptado del tratamiento del CCRm en función de la intencionalidad del tratamiento, estado funcional, características del paciente y perfil molecular del tumor (59). **[Figura 2]**



**Figura 2.** Algoritmo de tratamiento del CCRm de las directrices de consenso ESMO. Adaptado de Yoshino y cols, 2017 (59). Abreviaturas: FP: fluoropirimidinas; B: bevacizumab; QT: quimioterapia; OMD: oligometástasis; MSI-H: alta inestabilidad de microsatélites; wt: wild type; mut: mutado; tto: tratamiento.

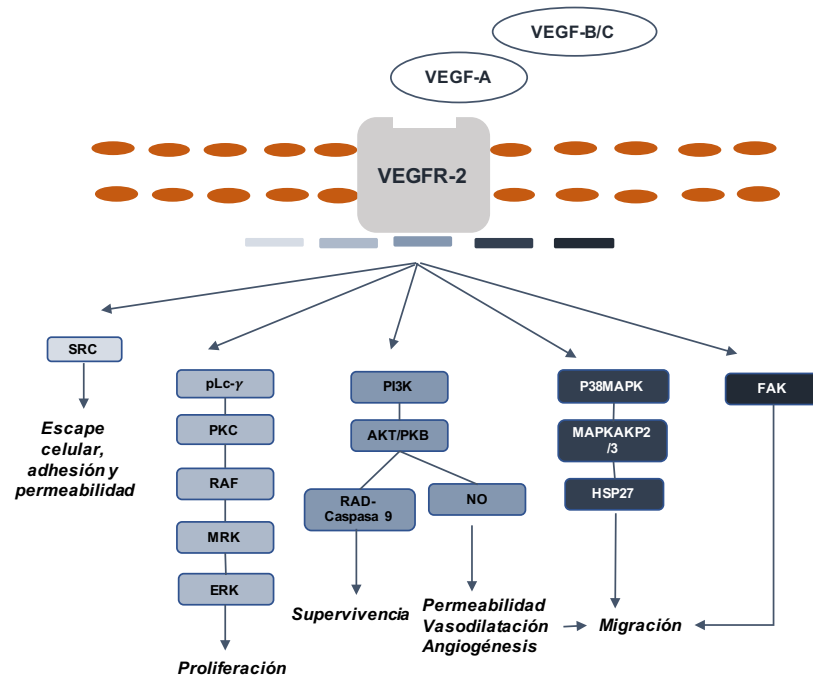
## 2. ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER

El proceso de angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de precursores endoteliales. De manera fisiológica, este fenómeno sucede durante la cicatrización de las heridas, la menstruación, la reparación ósea y la adaptación de los músculos al ejercicio (60). Además, se considera un proceso esencial en el crecimiento tumoral al proporcionar nutrientes, oxígeno y liberación de factores de crecimiento, facilitando la migración de las células tumorales y el desarrollo de metástasis (61). Son numerosos los ligandos y receptores estrechamente regulados en este proceso que participan en diferentes vías moleculares (62). El correcto

funcionamiento de este proceso dependerá de un adecuado equilibrio entre los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos.

## 2.1. VEGF y cáncer

Dentro de los efectores del proceso de angiogénesis se incluyen las isoformas de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) llamadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E y el factor de crecimiento placentario 1 y 2 (PIGF1 y PIGF2) (62). Además, existen tres receptores de VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 y dos co-receptores llamados neuropilina 1 y 2 (NRP1 y NRP2).



**Figura 3.** Representación de las vías de señalización de VEGFR-2 en las células endoteliales. La unión del ligando VEGF a VEGFR2 puede resultar en la activación de diferentes rutas como SCR, PLC- $\gamma$ , PI3K, P38MAPK y FAK. Adaptado de Geindreau y cols., 2021 (62).

El desencadenante principal y más estudiado del proceso de angiogénesis es la unión de VEGF-A a su receptor VEGFR-2. Esta unión permite la activación intrínseca de la tirosina quinasa del receptor, iniciando varias cascadas de señalización representadas en la **Figura 3**. La más importante es el reclutamiento de PI3K, que a su vez activa AKT

que fosforila directamente a la enzima óxido nítrico sintasa endotelial aumentando la producción de óxido nítrico (NO). El NO producido difunde de forma paracrina a las células musculares lisas vasculares adyacentes, activando la guanilato ciclasa soluble con aumento de la producción de GMPc y la consiguiente vasodilatación (61).

La función de VEGFR-1 es más compleja y menos conocida, su forma soluble impide la unión de VEGF-A con VEGFR-2 y por consiguiente la activación de esta vía de señalización (63). El tercer receptor, VEGFR-3, no se une a VEGF-A y está implicado en la linfangiogénesis. Por último, las NRP-1 y NRP-2 son unos receptores para mediadores neuronales, que actúan también como receptores de la isoforma VEGF165 (64).

Existen otros factores con funciones solapadas con el VEGF-A, incluyendo el PlGF, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el VEGF-C, el VEGF-D, la angiopoyetina, el factor inducible por hipoxia  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) y HIF-2 $\alpha$ , la integrina y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), permitiendo una correcta regulación de la activación o la inhibición de las vías de angiogénesis (65).

VEGF-A, también nombrado VEGF, fue descubierto en 1989, como un factor soluble derivado del tumor con efectos pleiotrópicos sobre la célula endotelial que incluyen la migración e invasión de la membrana basal, proliferación y formación de fenestraciones, estimulando el crecimiento de los vasos sanguíneos que nutren al tumor. Se compone de ocho exones y genera cuatro isoformas distintas mediante diferentes procesos de *splicing*: VEGFA121, VEGFA165 y VEGFA209, siendo VEGFA165 la isoforma más potente fisiológicamente en la inducción de la angiogénesis (66).

La angiogénesis junto con el aumento de la densidad vascular en el tumor primario se correlacionan con un peor pronóstico y su inhibición podría detener el crecimiento tumoral, desarrollándose el concepto de "terapia antiangiogénica". Existen en la actualidad tres mecanismos principales para bloquear la señal de este sistema: bloqueando la unión de VEGF a su receptor, bloqueando la señal a través de los

receptores de VEGF o bloqueando la actividad quinasa de VEGFR-1, -2 y -3 mediante el uso de inhibidores tirosin-quinasa (61).

## **2.2. Fármacos antiangiogénicos en cáncer colorrectal metastásico**

### *2.2.1. Bevacizumab*

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a VEGF evitando así su unión a los receptores VEGFR1 y VEGFR2 con reducción de la neovascularización y en consecuencia la proliferación y crecimiento tumoral. En combinación con la quimioterapia citotóxica ha demostrado beneficio en términos de SG en primera y segunda línea de CCRm.

El estudio fundamental AVF2107g, publicado en 2004 por Hurwitz y cols. (67), demostró beneficio de añadir bevacizumab en combinación con leucovorin (LV), consiguiendo su objetivo primario de aumento de SG (20,3 vs 15,6 meses (HR:0,66;  $p<0,001$ ), SLP (10,6 vs 6,2 meses;  $p<0,001$ ), así como tasa de respuestas objetiva (TRO, 44,8 vs 34,8%;  $p=0,04$ ).

Fue en 2008, cuando se publicaron estudios de la combinación de bevacizumab con otros esquemas de quimioterapia. El estudio fase III, BICC-C demostró que FOLFIRI con bevacizumab fue mejor en términos de SLP (11,2 vs 8,3 meses) y SG (28 vs 19,2 meses) comparado con IFL. Al mismo tiempo, se estudió la combinación con oxaliplatino en un estudio fase III (68) que comparaba FOLFOX frente a XELOX con o sin bevacizumab, cumpliendo su objetivo principal en SLP (9,4 vs 8 meses; HR= 0,83; IC 97,5%: 0,72-0,95;  $p=0,0023$ ), con tendencia a un incremento no significativo de SG (21,3 vs 19,9 meses; HR;  $p=0,077$ ). Además, en un ensayo controlado con placebo, bevacizumab fue asociado con una SLP mejorada cuando se combina con 5FU y LV en pacientes con CCRm para pacientes no candidatos a tratamiento con irinotecan por estado funcional (69).

En segunda línea sin tratamiento previo con bevacizumab, las mejoras en SG, SLP y TRO se observaron cuando se combinó bevacizumab con FOLFOX, en comparación con el tratamiento con FOLFOX solo, en pacientes con CCRm previamente tratados con un 5FU e irinotecán (70). Posteriormente, ensayos aleatorizados han ayudado a responder a la pregunta de si debe continuarse después de la progresión de la enfermedad modificando el esquema de quimioterapia. Fue el estudio ML18147 (71), el que demostró una mayor mediana de SG (11,2 vs 9,8 meses) en el grupo que continuaba bevacizumab, con mayor beneficio en función de la SLP.

La incorporación de los tripletes (FOLFOXIRI) asociados a bevacizumab, en población seleccionada y con independencia del perfil mutacional, han supuesto una mejora en términos de TRO, SLP y SG. Concretamente en el estudio TRIBE (72) se alcanzaron medianas de SG de 29,8 meses (95% CI 26,0-34,3) en el grupo de FOLFOXIRI más bevacizumab y 25,8 meses (95% IC 22,5-29,1) en el grupo comparador (HR 0,80, 95% IC 0,65-0,98;  $p=0,03$ ).

El perfil de toxicidad de bevacizumab es característico de su mecanismo de acción antiangiogénico, siendo poco frecuente y manejable en la mayoría de los casos. El más frecuente es la hipertensión arterial, siendo menos frecuente (<2%) el sangrado grave, proteinuria, eventos tromboembólicos venosos y arteriales y perforaciones intestinales.

### *2.2.2. Aflibercept*

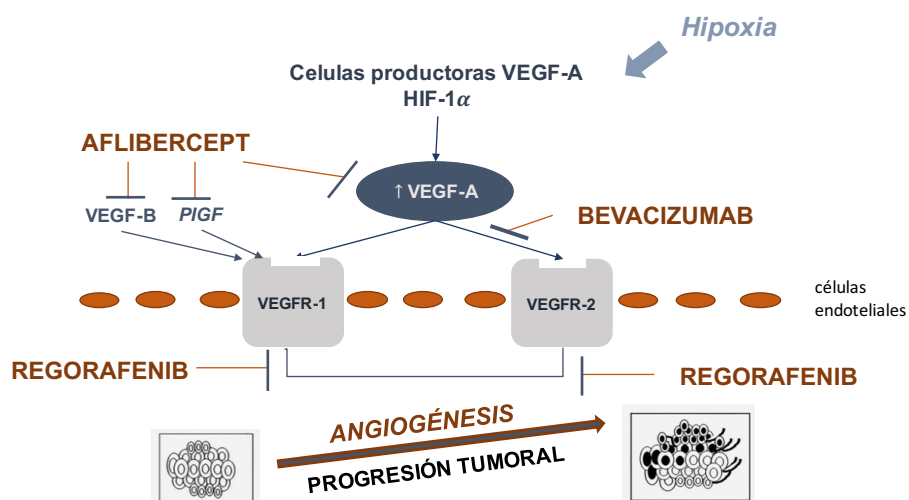
Aflibercept es una proteína de fusión recombinante que actúa como receptor señuelo para VEGF y el factor de crecimiento placentario (PlGF), que se unen a él con mayor afinidad que a sus receptores naturales, inhibiendo por tanto la actividad biológica de estos ligandos pro-angiogénicos. En combinación con FOLFIRI, ha demostrado beneficio clínico en segunda línea de CCRm independientemente del uso previo de bevacizumab. (HR= 0,817; IC del 95 %, 0,713-0,937;  $P = 0,0032$ ) con una mediana de supervivencia de 13,50 frente a 12,06 meses, respectivamente (73).



### 2.2.3. Regorafenib

Regorafenib es un potente inhibidor que bloquea varias proteínas quinastas, incluidas las implicadas en la angiogénesis tumoral (VEGFR1, -2, -3, TIE2), la oncogénesis (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAFV600E) y el microambiente tumoral (PDGFR, FGFR). El estudio fase III CORRECT (74), que comparaba regorafenib frente a placebo cumplió su objetivo primario en supervivencia global (HR 0,77; mediana 6,4 vs 5 meses;  $p=0,0052$ ) en pacientes con ECOG 0-1 que habían progresado a todas las opciones de tratamiento.

En la **Figura 4** se representa el mecanismo de acción de los fármacos con efecto antiangiogénico aprobados en CCRm.



**Figura 4.** Principales vías que involucran a VEGF-A y sus interacciones con los fármacos diana antiangiogénicos en el CCRm. Adaptado de Canavese y cols., 2017 (75). Abreviaturas: VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular; HIF: factor inducible por hipoxia; EGF: factor de crecimiento epidérmico; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; PlGF: factor de crecimiento placentario.

### 2.3. VEGF-A y cáncer colorrectal

El papel de VEGF-A en CCR ha sido evaluado en numerosos estudios que analizan su potencial valor pronóstico, siendo su valor predictivo más discutido por no disponer de

resultados consistentes, una técnica validada ni un punto de corte estandarizado. Su determinación ha sido evaluada a través de distintos procedimientos técnicos: inmunohistoquímica, niveles circulantes, ARNm y polimorfismos genéticos, entre otros. En este apartado, nos centraremos en los datos que disponemos a nivel plasmático por ser la metodología empleada en nuestro estudio.

La importancia de los niveles basales de VEGF-A como biomarcador se evaluó de forma retrospectiva en dos estudios de fase III: el estudio HORIZON II que aleatorizó 860 pacientes a recibir FOLFOX o XELOX con o sin cediranib, y el estudio HORIZON III que aleatorizó a 1422 pacientes para recibir FOLFOX-6 con cediranib o bevacizumab. El VEGF basal alto se asoció con una peor SLP tanto en el HORIZON II (HR=1,41; IC del 95 %, 1,21–1,65) y el HORIZON III (HR=1,20; IC 95 %, 1,04–1,38) y con una peor SG en el estudio HORIZON II (HR=1,35; IC 95 %, 1,12–1,63) (76).

En 2013, Hegde y cols. (77) midieron los niveles plasmáticos de VEGF-A en cuatro ensayos aleatorios de fase III de bevacizumab en CCR (AVF2107), cáncer de pulmón (ECOG E4599 y AVAiL) y renal (AVOREN), utilizando un enfoque de análisis estandarizado. Los niveles plasmáticos de VEGF-A, tuvieron valor pronóstico en todos los tipos de tumores, pero no valor predictivo del beneficio de bevacizumab.

Años más tarde, Divella y cols., publicaron en 2017 los resultados de una cohorte de 103 pacientes en la que aquellos niveles circulantes de VEGF >500pg/mL se asociaron con la existencia de metástasis hepáticas (p=0,004) (78). Fue ese mismo año cuando Taberero y cols., informaron de un análisis retrospectivo del estudio VELOUR (fase III que compara en segunda línea de CCRm la adición de aflibercept al esquema FOLFIRI) destinado a correlacionar la respuesta clínica en el grupo pretratado de bevacizumab y nueve biomarcadores relacionados con la angiogénesis. Respecto a VEGF-A observaron una asociación no significativa entre el aumento de sus niveles y la progresión de la enfermedad, lo que sugiere que el tratamiento con bevacizumab podría

modular la expresión de biomarcadores asociados con la resistencia al tratamiento, pero no implica que exista menor beneficio con aflibercept (79).

Posteriormente, Marisi y cols. publicaron un análisis retrospectivo con un total de 129 pacientes con CCRm tratados con bevacizumab procedentes del estudio fase III ITACA donde incluyeron un grupo control con quimioterapia sola. Analizaron los niveles de ARNm de VEGF circulante al inicio del estudio, en la primera evaluación clínica y en la progresión, observando que los pacientes tratados con bevacizumab con una reducción mayor o igual al 30% en los niveles de VEGF desde el inicio hasta la primera evaluación clínica mostraron una SG mayor en comparación con los que no la presentaron ( $p=0,008$ ), sin encontrar diferencias en aquéllos tratados con quimioterapia sola, concluyendo que una disminución en la expresión de VEGF desde el inicio hasta la primera evaluación clínica podría ser predictivo de respuesta a bevacizumab (80).

Un estudio más reciente de 2021 del Grupo de Tratamiento de los Tumores Digestivos (TTD) y realizado por Élez y cols. evaluó dentro del ensayo clínico fase II POLAF (81), en el que incluyeron 101 pacientes con CCRm en segunda línea con aflibercept combinado con FOLFIRI. Los resultados mostraron que los pacientes con VEGF-A < 1941pg/ml tuvieron una mediana superior de SG (19 frente a 8 meses; HR = 4,014, IC 95% 2,114–7,621,  $p < 0,001$  y SLP (9 frente a 4 meses; HR=1,004, IC 95% 1,002–1,007,  $p=0,002$ ).

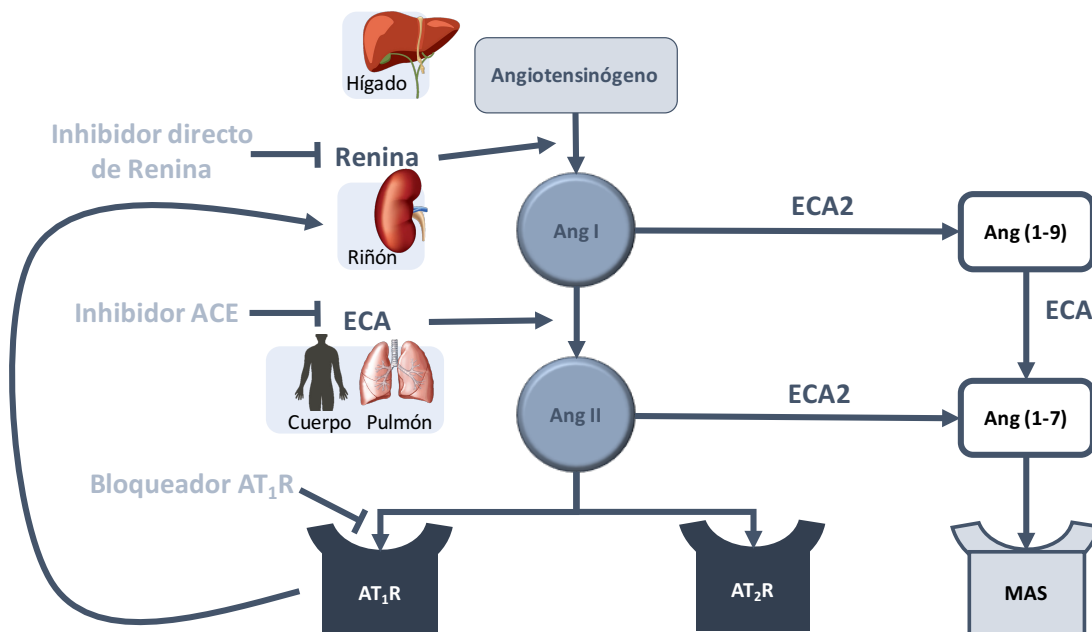
En la literatura también disponemos de otros estudios con resultados negativos. Así, Kopetz y cols. (82), en 2010 publicaron un estudio fase II con 40 pacientes con CCRm, en tratamiento de primera línea con FOLFIRI y bevacizumab, no encontrando relación significativa entre los niveles basales en plasma de VEGF y la SLP o SG. Igualmente, en publicaciones más recientes, Karpuz y cols., evaluaron en 37 pacientes con CCRm, donde los niveles previos al tratamiento de VEGF no estaban correlacionados con la supervivencia ( $p=0,064$ ) (83). En 2015, Moreno-Muñoz y cols (84), publicaron en un total de 46 pacientes con CCR y 49 de cáncer de mama en tratamiento con bevacizumab, en

cualquier momento del curso del tratamiento, no observándose relación entre los valores plasmáticos de VEGF-A y la supervivencia. Finalmente, Suenaga y cols, en 2019 tampoco encontraron correlación significativa entre los niveles basales de VEGF-A y la respuesta, SLP y SG en más de 200 pacientes tratados con FOLFOX con o sin bevacizumab (85).

### **3. ANGIOGÉNESIS Y SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA**

El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) desempeña un papel fundamental en la patogenia de numerosos tipos de enfermedades cardiovasculares. Además de ejercer efectos reguladores clásicos sobre la presión arterial y la homeostasis del sodio, el SRAA está involucrado en la regulación de la contractilidad y la remodelación cardiovascular (86). Numerosos estudios han demostrado el beneficio de la inhibición de este sistema en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, siendo la desregulación y sobreexpresión del SRAA un inductor del inicio del daño vascular (87). La vía clásica de la cascada de péptidos del SRAA está representada en la **Figura 5**. En este escenario, se ha propuesto la existencia de dos ejes que actúan como complementarios en el SRAA. Un primer eje, mejor conocido y constituido por la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), la angiotensina II (Ang-II) y el receptor transmembrana AT-1 (ECA-Ang II-receptor AT1), que además de la vasoconstricción y aumento de la volemia, induce a nivel local proliferación celular, angiogénesis, hipertrofia, inflamación, estrés oxidativo y fibrosis, entre otros procesos. Un segundo eje está constituido por la ECA2, que a partir de la Ang-II produce angiotensina 1-7, un péptido que actúa sobre el receptor Mas. Este eje ECA2/Ang1-7/Mas realiza una acción contraria con efecto vasodilatador, antihipertrófica, antiangiogénica y antiproliferativa (88).

En relación con la ECA, esta enzima forma parte de una gran familia de metalopeptidasas. Existen dos isoformas, la somática y la germinal (testicular), ambas codificadas por el gen *ACE* situado en el cromosoma 17q23. En este gen existe un polimorfismo de inserción/delección (I/D) cuyas variantes afectan a los niveles circulantes de la proteína codificada y que han sido relacionadas con el riesgo de desarrollar diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (89). Aunque el sustrato natural más conocido es la Ang-I, que la enzima convierte en Ang-II, existen otros sustratos naturales de la ECA, como la bradiquinina, (vasodilatadora y natriurética), que degrada y la convierte en péptido inactivo (90). Otras importantes funciones incluyen la hematopoyesis, la reproducción, el desarrollo y la función renal y la respuesta inmune (91).

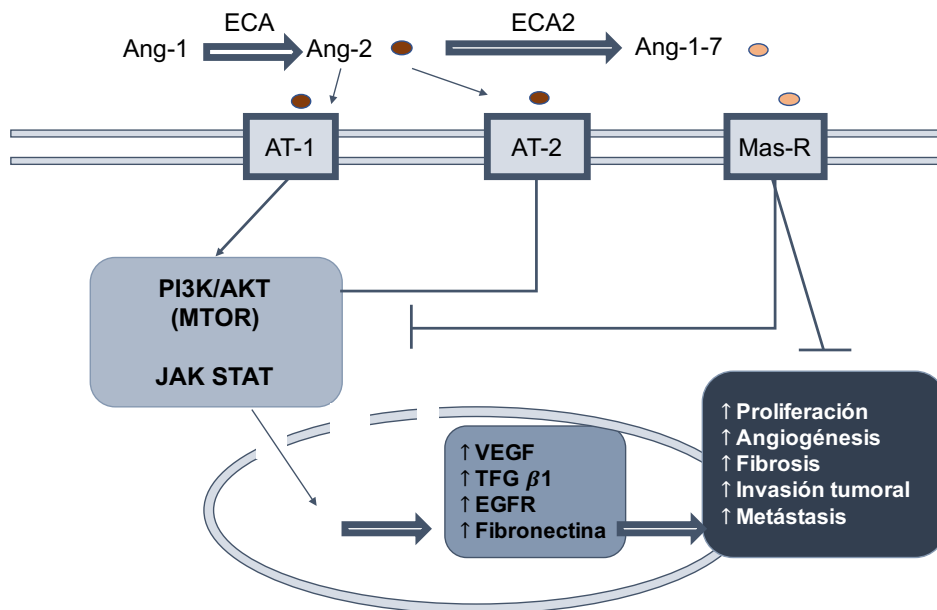


**Figura 5.** Representación de la vía clásica de la cascada del SRAA. Adaptado de Laghnam y cols., 2021(92)  
 Abreviaturas: ECA: enzima convertidora de angiotensina; Ang: angiotensina; AMP: aminopeptidasa; AT1: receptor Ang II tipo 1; AT2: receptor Ang II tipo 2; Mas: receptor de Ang (1–7).

### 3.1. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, angiogénesis y cáncer

El SRAA se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de tumores incluyendo el renal, gástrico, colon, pulmón, páncreas y neoplasias hematológicas (93, 94) en comparación con el correspondiente tejido normal. Esto sugiere una relación entre SRAA y la progresión tumoral, dependiente de la actuación sobre el proceso de angiogénesis.

En los diferentes estudios que analizan la relación entre el SRAA y el cáncer no se obtienen resultados concluyentes, probablemente debido a la complejidad del sistema y su participación en el equilibrio de la actividad proliferativa y angiogénica. Las acciones opuestas entre los efectores y receptores del SRAA y el proceso de angiogénesis están representadas en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Vías de señalización de los receptores del SRAA relacionadas con la biología del cáncer. La señalización de los receptores AT-1 activa las vías MAPK, PI3K/AKT/MTOR, NF-κB y JAK/STAT y aumenta VEGF, TGFβ1, EGFR y fibronectina, lo que finalmente conduce a una mayor proliferación celular, angiogénesis, fibrosis, invasión tumoral y metástasis. Estas vías son inhibidas por la señalización de Mas mediada por AT-2 y Ang 1-7. Adaptado de Afsar y cols., 2021 (95). Abreviaturas: SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona, AT-1: receptor de angiotensina tipo 1; MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno; PI3K/AKT: vía fosfatidilinositol 3 quinasa; mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero, JAK/STAT: quinasa de Janus y transductor de señal y activador de la transcripción; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta 1; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Además, la ECA también puede actuar de manera independiente a la cascada SRAA-AT-1, como miembro de un conjunto de proteasas transmembrana involucrada en la degradación de la matriz extracelular, siendo fundamental en el proceso de angiogénesis (96). Concretamente estarían implicados cada uno de los tres substratos que escinde. El primero, la bradiquinina se acumula estimulando a los receptores de bradiquinina (BR-1 y BR-2) sobre las células de microambiente tumoral, conduciendo a la regulación positiva de FGF y VEGF que favorecen el crecimiento y proliferación tumoral. El segundo, la sustancia P (neuroquina liberada por neuronas sensoriales implicadas en el dolor y la inflamación) activa el receptor de neuroquinina-1, facilitando la proliferación celular, angiogénesis, supervivencia celular y migración de las células tumorales proporcionándoles mayor capacidad de invadir y metastatizar. Por último, el tercer substrato, la Acetyl SDKP (N-acetil-seril aspartil-lisil-prolina), que está aumentada en pacientes con cáncer, aunque su verdadero papel aún se desconoce, se cree que también participa en la angiogénesis (95).

Numerosos estudios describen una expresión aumentada de la ECA en el cáncer de próstata, colon, páncreas, mama y en el glioblastoma (97). A su vez, la expresión y actividad de la ECA2 disminuye en el cáncer de páncreas y aumenta en el cáncer de colon. En cuanto a los receptores, especialmente en el caso del AT-1, está más relacionado con un aumento de expresión en el cáncer de próstata, hígado y mama. Además, se ha visto que podrían existir variaciones significativas de los componentes del SRAA en función de la agresividad y evolución tumoral, lo que implicaría un valor pronóstico (98).

La relación entre el bloqueo del SRAA y la incidencia y/o mortalidad por cáncer ha sido evaluado en varios estudios, aunque la evidencia actual sigue siendo inconsistente (99, 100). Además, dado el papel del SRAA en el microambiente tumoral se ha sugerido que su bloqueo podría ser una herramienta eficaz en el tratamiento de tumores sólidos (101). Concretamente en pacientes con CCR, el último metaanálisis publicado (101), incluyó

37 estudios observacionales, mostrando que los fármacos antihipertensivos no presentaron un efecto significativo sobre el riesgo o la SG (RR = 1,00, IC 95%: 0,95-1,04; HR = 0,93, IC 95 %: 0,84-1,02), con una mejor SLP en los pacientes con CCR (HR = 0,83; IC 95 %: 0,72-0,95).

### **3.2. Enzima convertidora de angiotensina y el cancer colorrectal**

Las concentraciones plasmáticas y tisulares de la ECA, y por lo tanto los niveles de Ang-II, están determinadas en gran parte por el gen *ACE*. En 1990, Rigat y cols. (102) identificaron un polimorfismo consistente en la presencia o ausencia de un fragmento de ADN de 287 pares de bases en el intron 16 del gen de la ECA; un polimorfismo de inserción (I) o deleción (D) y por lo tanto tres genotipos (D/D, I/I e I/D). Las concentraciones séricas de ECA fueron significativamente más altas en los homocigotos con el alelo de deleción más corto (D/D) que en los heterocigotos (I/D) o en los homocigotos con el alelo de inserción más largo (I/I). Se concluyó que el polimorfismo I/D era responsable de casi el 50% del total de la variabilidad de ECA en suero, mostrando que el locus del gen *ACE* es el que determina la concentración de ECA sérica (103).

Centrándonos en lo publicado en CCR, una cohorte prospectiva de 6670 pacientes del estudio epidemiológico de Rotterdam en 2008 (104), exploró con una media de seguimiento de 9,6 años, la relación entre los genotipos de *ACE* y el riesgo de cáncer colorrectal, pulmón, mama y próstata, mostrando que ser portador del genotipo D/D se correlacionó con un riesgo mayor de cáncer de mama (HR=1,47 IC 95% 1,05–2,04), sin encontrar asociación en el resto de tumores.

En 2015 Yang y cols. (105), llevaron a cabo un metaanálisis que incluyó dieciséis publicaciones de tumores digestivos sin encontrar diferencias significativas en el análisis global, pero hubo un incremento de riesgo para CCR del 16% (OR = 1,16, 95 % IC: 0,89-



1,52,  $p=0,273$ ). Fue ese mismo año, cuando Zhou y cols., publicaron otro metaanálisis que incluía los polimorfismos de *ACE* y de la survinina. Concretamente, para el polimorfismo *ACE* (I/D), cinco estudios fueron incluidos con 758 casos y 6755 controles, donde no se demostró asociación en ningún modelo genético, concluyendo que dicho polimorfismo no es un factor genético relacionado con el CCR (106).

Siguiendo esta línea de investigación, nuestro grupo, en 2015 (84) exploró la relevancia clínica de los polimorfismos genéticos en algunos componentes del SRAA y su relación con la terapia antiangiogénica. Para ello, se aisló ADN genómico de sangre periférica y se analizaron los niveles circulantes de ECA, en 46 pacientes con CCR y 49 con cáncer de mama tratados con bevacizumab. Entre los resultados obtenidos se encontró que el genotipo *ACE* I/I se asoció con una mayor tasa de progresión de la enfermedad en comparación con D/I y genotipo D/D (36% vs. 11,1%  $P < 0,05$ ). Así mismo, el genotipo *ACE* I/I se asoció con un tiempo más corto hasta el fracaso del tratamiento en comparación con los genotipos *ACE* I/D y *ACE* D/D (14 frente a 41,71 semanas,  $p=0,033$ ). Respecto a los niveles circulantes, se mostró que los mayores niveles de ECA, con un punto de corte establecido en 135ng/mL, estaban asociados con una mejor respuesta al tratamiento con bevacizumab.

Posteriormente, en 2019, Cheng y cols. (107), realizaron un metaanálisis para aclarar la correlación entre los polimorfismos genéticos del SRAA y el desarrollo de CCR. Seleccionaron seis estudios del polimorfismo de I/D del gen *ACE*, concluyendo que no existía correlación en la población total (D/D frente a I/I: OR 0,77, IC 95 % 0,39–1,50; D/I frente a I/I: OR 1,05, IC 95% 0,85-1,30; modelo dominante: OR 0,94, IC 95% 0,68–1,31; modelo recesivo: OR 1,01, IC 95% 0,80-1,27).

Los datos más recientes de niveles circulantes de ECA en cáncer colorrectal, son los derivados del ensayo clínico fase II POLAF (81), publicado en 2021 y comentado anteriormente. Respecto al análisis del valor de ECA, estableciendo el mismo punto de corte de 135ng/mL, publicado por Moreno-Muñoz y cols., en este caso no se

identificaron diferencias entre los niveles circulantes y la SG, el tiempo hasta la progresión (TTP) y la tasa de respuesta (TR) de los pacientes analizados, no pudiendo aclarar con estos resultados su valor pronóstico y predictivo en CCRm.

La dificultad radica en que no disponemos de resultados consistentes en los estudios publicados que plantean la hipótesis de una asociación entre los polimorfismos del gen *ACE* y el riesgo de incidencia o mortalidad en los diferentes tipos de tumores, entre ellos el CCR (89). Esto podría explicarse en parte por la falta de potencia estadística de los estudios, las diferentes técnicas de genotipado y la dificultad en la selección de la población de estudio.

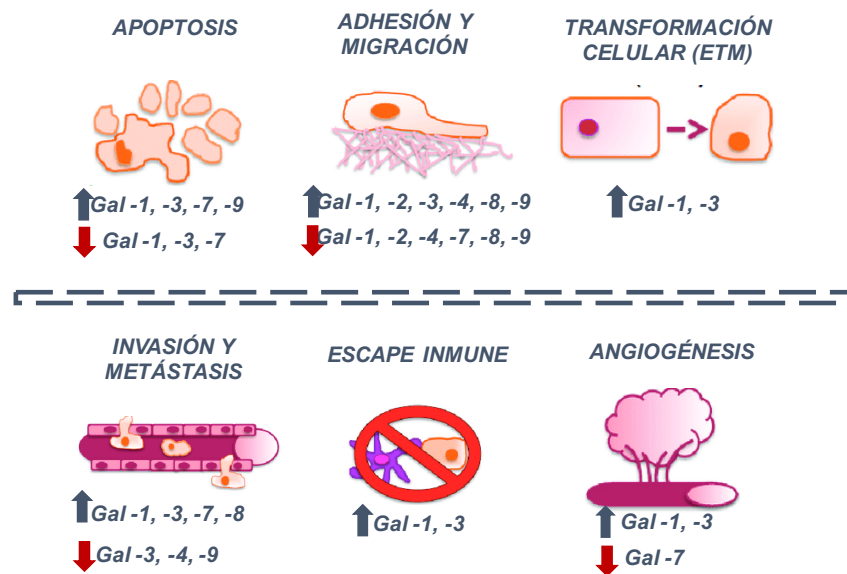
#### **4. ANGIOGÉNESIS Y GALECTINAS**

Las galectinas son proteínas que forman parte de la familia de lectinas y ejercen su función por unión a glicoconjugados, que son estructuras de carbohidratos unidos a proteínas, péptidos y lípidos, que descifran la información codificada por la maquinaria de glicosilación y la traducen en funciones celulares (108). Hasta la fecha, se han identificado 15 galectinas en mamíferos y 11 se encuentran en humanos, actuando tanto intracelular como extracelularmente.

Las galectinas pueden ser clasificadas en tres grupos según su estructura (109): 1) galectinas prototipo que contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) que puede formar homodímeros; 2) galectinas de tipo repetido en tándem que contienen dos DRC y están conectados por un conector flexible; y 3) galectina-3 de tipo quimérico que contiene un dominio DRC y una extensión N-terminal que puede formar oligómeros para aumentar su avidéz de unión.

En general, las funciones de las galectinas **[Figura 7]** incluyen la regulación del crecimiento celular, la apoptosis, la interacción entre células, adhesión célula-matriz, extracelular, polaridad celular, motilidad, diferenciación, transformación, transducción

de señales e inmunidad innata/adaptativa. Debido a sus múltiples funciones, actúan en procesos tan importantes como la apoptosis, angiogénesis, la migración celular y el escape inmune tumoral, estando implicadas en la biología del cáncer (110). Concretamente en las células tumorales, potencian las señales oncogénicas y reducen la apoptosis, promoviendo la transformación y proliferación tumoral (111).



**Figura 7.** Las galectinas están asociadas con aspectos clave de la carcinogénesis, incluida la apoptosis, la adhesión y la migración, la transformación celular, la invasión y metástasis, el escape inmunitario y la angiogénesis. Sus funciones pueden ser pro y/o antitumorales, como se indica mediante flechas grises hacia arriba y flechas rojas hacia abajo, respectivamente. Adaptado de Dings y cols., 2018 (112). Abreviaturas: Gal-: galectina. ETM: transición epitelio mesenquimal.

En la angiogénesis juegan un papel crucial, especialmente la galectinas-1, -3, -8 y -9. Ito y cols. (113) publicaron que la galectina-1 extracelular promueve la angiogénesis tumoral reforzando y estabilizando conexiones de células endoteliales vasculares e interacciones de la matriz extracelular dentro del microambiente tumoral. Se han propuesto dos mecanismos mediados por galectina-1 para favorecer la angiogénesis: 1) por interacción con NRP-1 en la superficie endotelial, que actúa como co-receptor de VEGF en las células endoteliales, galectina-1 mejora la fosforilación del VEGFR y posterior activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). 2) La galectina-1 puede ser captada por las células endoteliales asociadas al tumor y

estimular la proliferación celular del endotelio, adhesión y migración con resultado de activación de la señalización endotelial de la vía Ras-Raf-Erk. La galectina-3 tiene actividad angiogénica *in vitro e in vivo*. Markowska y cols. (114) investigaron que la galectina-3 se une a integrinas en la superficie endotelial, seguida de la activación de la adhesión focal y promoción mediada por VEGF y por el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) a través de la unión con N-glicanos, activando vías de señalización mediadas por FAK que modulan la migración de células endoteliales en la cascada angiogénica. Un estudio posterior (115) mostró que la galectina-3 también se une a VEGFR-2 para aumentar la respuesta angiogénica a VEGF-A. Además, la acción combinada de la galectina-1 y la galectina-3 pueden aumentar el efecto sobre la angiogénesis a través de la activación de VEGFR-1 y la disminución en la endocitosis del receptor (116). Galectina-9 parece ser la única galectina con un efecto inhibitor sobre la angiogénesis, aunque aún queda por establecer cuáles son los mecanismos que subyacen a este efecto (117), que se ha relacionado con el entrecruzamiento de diferentes receptores como VEGFR-2, NRP-1, beta-integrinas, y CD166 (118), donde la galectina-9 probablemente participe.

#### **4.1. Galectina-1, -3 y -9 en cáncer colorrectal**

En el tejido colorrectal sano se expresan las galectinas-1, -3, -4 y -8, mientras que galectina-1 presenta expresión débil, galectina-3 presenta altos niveles nucleares. Las células en la base de la cripta tienen una expresión de galectina-3 débil o negativa y la intensidad va aumentando progresivamente desde la base hasta la superficie de la glándula. Ya en 1997, aparece la primera publicación sobre el valor de expresión de galectinas-3 y -1 en CCR, donde analizan mediante inmunohistoquímica muestras de adenomas, carcinomas y lesiones metastásicas, describiendo que su sobreexpresión

citoplasmática aumenta con la progresión tumoral (119). De todas las galectinas profundizaremos en las -1, -3 y -9, por ser las analizadas en nuestro trabajo.

De la que disponemos más evidencia en CCR es de la galectina-3. Aunque algún estudio ha demostrado que una disminución de la expresión de galectina-3 ocurre en las primeras etapas de la progresión tumoral (120), son muchos otros los que han relacionado su sobreexpresión con el desarrollo de metástasis, postulándose como un posible nuevo biomarcador pronóstico (121). En 2011 Povegliano y cols. (122), realizaron un estudio de galectina-3 mediante inmunohistoquímica de 35 CCR, concluyendo que su mayor expresión citoplasmática parece ser un factor pronóstico con mayor riesgo de recurrencia ( $p = 0,046$ ). Años más tarde fueron Tao y cols. (123), quienes investigaron la correlación entre la expresión de galectina-3 mediante inmunohistoquímica y las variables clínico-patológicas de 61 CCR y 23 muestras de tejido normal adyacente. Los autores encontraron una correlación significativa con el tamaño tumoral, la diferenciación tumoral y la estadificación de Duke.

Así mismo, en los últimos años disponemos de dos metaanálisis que apoyan estos resultados. Uno publicado en 2018 por Wang y cols (124), en distintos tipos de tumores, con 36 estudios elegidos y en el análisis por subgrupos se correlacionó la alta expresión de la galectina-3 en CCR con menor SG y SLE/SLP (HR combinado= 3,05, IC95% 2,13–4,35,  $p=0,734$ ; HR combinado= 2,49, IC95% 1,82–3,41,  $p=0,738$ ; respectivamente). En el otro, publicado en 2019, se incluyeron 15 estudios con 1661 pacientes para explorar la asociación de la galectina-3 con la SG y las características clinicopatológicas del CCR (125). Este metaanálisis encontró asociaciones estadísticamente significativas de la mayor expresión de galectina-3 con una SG más pobre (HR = 1,77, IC95 % 1,36-2,31,  $p<0,0001$ ) y peores características clinicopatológicas.

También se han analizado la expresión de las galectinas mediante determinación de ARNm. Gopalan y cols. describieron que las proteínas de la galectina-1 y -3 se expresaron significativamente más en los CCR en comparación con los adenomas (95%

y 61%, respectivamente). Por el contrario, los pacientes con CCR con niveles elevados de ARNm de galectina-3 y expresión de proteínas mostraron un mejor pronóstico ( $p=0,052$ ) (126).

En el cáncer de mama, la expresión de la galectina-9 produjo la agregación de células tumorales y estas fueron menos agresivas, evitando las metástasis y prolongando la supervivencia (127). Sin embargo, el papel de galectina-9 en el CCR sigue siendo desconocido. En un estudio muy reciente publicado por Morishita y cols. (128), se evaluaron los efectos de galectina-9 en células de CCR y de tejido sano *in vitro* e *in vivo*. Se observó que galectina-9 suprime la proliferación celular del CCR humano mediante la inducción de la apoptosis. Estos hallazgos sugieren que galectina-9 podría ser un potencial biomarcador y diana terapéutica en pacientes con CCR.

## **5. ANGIOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL**

Existe una estrecha interacción entre el proceso de angiogénesis y la respuesta del sistema inmune contra el tumor. Se sabe que la proteína VEGF-A modula la respuesta inmunitaria innata y adaptativa directa o indirectamente por tres vías diferentes: 1) mediante su interacción con las células inmunitarias, 2) modulando su expresión en las células endoteliales y 3) modulando la permeabilidad vascular. Por otro lado, las células inmunitarias inmunosupresoras pueden producir factores proangiogénicos y promover la angiogénesis, creando un fenómeno de retroalimentación positiva. Así mismo, la inhibición de la vía de señalización del VEGF-A pueden modular la vasculatura del tumor y por tanto la respuesta inmunitaria frente al mismo.

### 5.1. Respuesta inmune innata

Las respuestas anti o pro-tumorales del sistema inmune dependen del microambiente tumoral. Son numerosas las células inmunitarias innatas que promueven la angiogénesis mediante la producción de VEGF-A, incluyendo las células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSC) (129), los macrófagos (130), los neutrófilos (23), las células *natural killer* (NK) (131) y los mastocitos (132). Existen numerosos mecanismos que inducen la angiogénesis mediada por VEGF-A y sus receptores por parte de las células inmunitarias innatas. Por un lado, los macrófagos, los neutrófilos N2, las MDSC y los mastocitos la promueven mediante la producción de las metaloproteasas de matriz extracelular, como MMP-9, que es una proteína conocida por escindir la matriz extracelular y liberar factores de crecimiento unidos a la heparina, como el VEGF-A (133, 134). Además, las MDSC producen FGF-2 y los mastocitos generan FGF-2, IL-8, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), moléculas que participan en la angiogénesis (134). Los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas (DC) pueden expresar VEGFR-1 y VEGFR-2 en su superficie celular (135) y las NK humanas el VEGFR-3 (136). Igualmente, los mastocitos humanos expresan VEGFR-1, VEGFR-2, NRP- 1 y NRP-2 y las MDSC dentro del tumor tanto el VEGFR-1 como el VEGFR-2 (137).

La presencia de macrófagos asociados a tumores está relacionada con mal pronóstico en el cáncer de mama, el linfoma de Hodgkin y el cáncer de tiroides (138, 139). *In vitro*, el VEGF-A aumenta la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo M2 y su capacidad de migración celular (130). La estimulación de las NK con TGF $\beta$ -1 y las NK periféricas sometidas a hipoxia aumentan la producción de VEGF-A y PlGF (140). Recientes estudios han intentado aclarar el papel de las NK en la angiogénesis tumoral, describiendo que aquellas células NK deficientes en STAT5 son capaces de producir mayores niveles de VEGF-A (141), que la inhibición de HIF-1 $\alpha$  en las células NK frena

el crecimiento tumoral (142) y que la unión del VEGF-C al VEGFR-3 presente en la membrana de las células NK induce una señalización que reduce la citotoxicidad de las mismas (136).

En estado estacionario, el VEGF-A recluta los neutrófilos CD49d+ al tejido, a través de la vía de señalización de VEGFR-1 y -2 (143). Los neutrófilos humanos estimulados por VEGF-A muestran un aumento de la fosforilación de ERK, lo que sugiere que VEGF-A activa la señalización del VEGFR-1 en los neutrófilos (143).

Los mastocitos en el cáncer de mama tiene actividad anti-tumoral, siendo pro-tumoral en el cáncer de tiroides, gástrico y el linfoma de Hodking (144). Se ha observado una reducción de las capacidades angiogénicas y metastásicas en ratones deficientes en mastocitos (145). Además, la IL-6 (146), la IL-9 (147), la prostaglandina E2 (PGE2) (148), la hormona liberadora de corticotropina (149, 150) y la adenosina (150) pueden aumentar por parte de los mastocitos la producción continua de VEGF-A.

Estudios en diferentes tipos de tumores han demostrado que la infiltración de las MDSC en el tumor se asocia con una mayor concentración de VEGF-A (151). La hipoxia producida por el tumor conduce a las MDSC a liberar VEGF directa o indirectamente a través de la producción de TGF- $\beta$  o adenosina. Además, VEGF-A tiene la capacidad de mejorar la infiltración de las MDSC en el tumor, creando un ciclo de retroalimentación positiva (152). En el tumor, las MDSC expresan VEGFR-2, siendo esta vía su entrada en la EMT y los anticuerpos dirigidos frente al receptor la bloquean reduciendo su migración. Además, el aumento de VEGF-A provoca a través de las MDSC una reducción de la infiltración de las células T citotóxicas en el tumor (153).

El VEGF-A tiene la capacidad de inhibir la migración de las células dendríticas maduras a través de la vía VEGF-A/RhoA-cofilina1 (135). El aumento del número de células dendríticas inmaduras en pacientes con cáncer de mama, de cabeza y cuello o de pulmón, se ha asociado a una elevada concentración de VEGF-A en plasma y a una enfermedad más avanzada (154). Esto sugiere que el VEGF-A podría afectar a la



diferenciación desde los monocitos (155) y el VEGFR-1 bloquearía su maduración a través de la activación del NF-B (156). Se han descrito funciones contradictorias en relación con el papel de HIF1- $\alpha$  en las células dendríticas. Cuando estas carecen de HIF1- $\alpha$  desempeñan un papel fundamental en la presentación del antígeno y en cambio, cuando tienen una expresión constitutiva aumentan la producción de IL-10 y VEGF-A. Por este motivo, se relaciona a HIF1- $\alpha$  con una limitación en la inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa (157).

## **5.2. Respuesta inmune adaptativa**

El VEGF-A desempeña un papel negativo en el desarrollo de las células T, induciendo una disminución de las células T CD4+ y CD8+, reduciendo las células progenitoras hematopoyéticas tempranas (158) y pudiendo inhibir directamente la proliferación de las células T CD3+ así como su citotoxicidad. Esta inhibición la realiza a través de la vía de señalización VEGF/VEGFR-2 (159). Curiosamente, las células tumorales que producen VEGF-A, son capaces de aumentar la expresión del receptor de muerte celular programada 1 (PD-1), la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la inmunoglobulina de células T y el dominio de mucina 3 (TIM-3) en la superficie de las células T CD8+, lo que induce el agotamiento de las células T, participando en el establecimiento de un microambiente inmunosupresor. Este fenómeno puede revertirse utilizando un anticuerpo anti-VEGF-A o un inhibidor de la tirosina quinasa dirigido al VEGFR (160).

Por otro lado, el factor pro-angiogénico VEGF interactúa con las Treg, ya que aquellas que presentan alto nivel de FOXP3 expresan VEGFR-2 en su superficie celular. El VEGF aumenta el reclutamiento de Treg en el tumor, contribuyendo a un microambiente inmunosupresor (161).

En resumen, la angiogénesis desempeña un papel fundamental en la modulación del microambiente inmunitario del tumor. En este sentido, VEGF-A contribuye a este proceso al inhibir la proliferación y diferenciación de células efectoras inmunitarias activadas, al tiempo que recluta células inmunitarias supresoras asociadas al tumor (162).

## **6. BIOMARCADORES Y BEVACIZUMAB**

En oncología, los biomarcadores pronósticos son utilizados para identificar la probabilidad de supervivencia, recurrencia o progresión de la enfermedad mientras que los predictivos son aquellos utilizados para seleccionar a los individuos que tienen más probabilidades de experimentar un efecto favorable o desfavorable de la exposición a una terapia (163). Un biomarcador ideal debería ser fácil de medir y cuantitativo, altamente específico y sensible, a la vez que fiable y reproducible.

A pesar de los avances realizados en los últimos años, los resultados de múltiples análisis a gran escala para la búsqueda de biomarcadores en la terapia antiangiogénica, han ofrecido resultados contradictorios sin haber mostrado ninguno un valor predictivo consistente y por tanto su validez de uso en la práctica clínica (61).

A continuación, en la **Tabla 3** se describen los estudios más relevantes realizados sobre posibles biomarcadores para terapia con bevacizumab en CCRm (164).

**Tabla 3.** Resumen de la evidencia de posibles biomarcadores en pacientes con CCRm tratados con bevacizumab asociada a la quimioterapia.

BIOMARCADOR	Determinación	Autor (año)	Diseño estudio	SLP (mediana meses)	SG (mediana meses)	Ref.
<b>VEGF-A</b>						
	<i>rs13207351</i> G/G vs G/A+A/A	Formica y cols. (2011)	P (n=40)	8,9 vs 15,4 meses; HR = 3,53; p=0,007	NS	(165)
	<i>rs1570360</i> G/G vs G/A+A/A			9,8 vs 16 meses; HR 2,32; p=0,03	NS	
	<i>rs833061</i> C/C vs C/T vs T/T	Loupakis F y cols. (2011)	R (n=111)	12,8 vs 10,5 vs 7,5 meses; HR = 2,13, [1,41-5,10]; p=0,0027	27,3 vs 20,5 vs 18,6 meses; HR=2,22, IC95% 0,54-5,51; p=0,195	(166)
	<i>rs25648</i>	Becouarn y cols. (2014)	P (n=45)	NS	HR = 0,605, IC 95%, 1,57-8,30; P=0,0104.	(167)
	<i>rs3025039</i> C/C vs C/T+T/T	Sibertin-Blanc y cols. (2015)	R (n=89)	14,2 vs 7,0 meses; HR=0,57; p=0,022	29,1 vs 19,7 meses; p=0,016	(168)
<b>VEGFR-2</b>						
	<i>rs12505758</i> T/T vs C/T vs C/C	Loupakis F y cols. (2013)	P (n=424)	10,9 vs 9 vs 10,7 meses HR=1,34 (C/T);1,57(C/C); p=0,045	NS	(169)
<b>MicroRNA-126</b>						
	<i>Plasmático</i> Alta vs baja expresión	Hansen y cols. (2015)	P (n=68)	9,3 vs 7,3 meses HR=0,53 (IC95%, 0,29–0,97), p=0,02	-	(170)
		Hansen y cols. (2013)	P (n=89)	HR=0,49, 95% IC=0,29-0,84, p=0,009	-	(171)
<b>Angiopietin-2</b>						
	<i>Plasmático</i> ≤ 5 vs >5ng/mL	Jary y cols. (2015)	P (n=177)	-	26,2 vs 17,8 meses; HR=1,59; 95% CI, 1,14-2,21; p=0,0065	(172)
<b>LDH</b>						
	Plasmático	Feng y cols. (2019)	Metaanálisis (n=1219)	HR: 1,43, 95% CI: 1,05-1,94; P=0,023	HR: 1,667, 95% CI: 1,230-2,259; P=0,001	(173)

BIOMARCADOR	Determinación	Autor (año)	Diseño estudio	SLP (mediana meses)	SG (mediana meses)	Ref.
<b>FLT1</b>						
	rs9513070 A/A vs A/G+G/G	Sohn y cols. (2015)	P (n=125)	8,7 vs 6,6 meses; HR=0,50; p=0,012	26 vs 16,1 meses; HR=0,64; p=0,072	(174)
<b>PDGFR-β</b>						
	rs2302273 C/C vs C/G +T/T	Volz y cols. (2015)	R (n=424)	9,9 vs 11,1 meses HR = 0,76; p=0,016	NS	(175)
<b>CD31</b>						
	IHQ Altavsbaja expresión	Bianconi y cols. (2020)	P (n=74)	11,28 vs 4,92 meses 0,53, IC 95%: 0,30–0,95, p=0,034	-	(176)
<b>Gen R-spondin 2</b>						
	rs555008 G vs TT	Berger y cols. (2020)	P (n=773)	8,1 vs 11,2 meses, HR 1,93 p=0,023 RAS mutado	-	(177)
<b>CCL5/CCR5</b>						
	rs2280789 G QT+B vs QT	Suenaga y cols. (2019)	P (n=202)	19,8 vs. 11,0 meses, HR 0,44, IC95%: 0,24-0,83, p = 0,004	41,8 vs 24,5 meses, HR: 0,50, IC95%: 0,26-0,95, p=0,024	(85)
<b>18q11.2-q12.1</b>						
	Nº copias QT vs QT-B	Dijk y cols. (2022)	R (n=181)	p= 0,009; HR=0,64; IC95 % = 0,46- 0,89	-	(178)
<b>IL-8</b>						
	Plasmático ≥145 pg/mL	Marisi y cols. (2018)	P (n=58)	6,5 vs 12,6 meses; HR 7,39, P<0,0001 y 8.7 vs 28.8 meses, HR 7,68, p<0,001	8,7 vs 28,8 meses, HR 7,68, IC95% 2,59–22,77 p<0,001	(179)

Abreviaturas: SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; Ref.: referencia; P: prospectivo; R: retrospectivo; QT: quimioterapia; B: bevacizumab.

**En resumen,** el conocimiento de la biología molecular en el cáncer y el avance hacia una oncología personalizada, hace necesaria la identificación de biomarcadores útiles y factibles que nos permitan una selección adecuada de aquellos pacientes que puedan beneficiarse de una determinada terapia o un mejor conocimiento del pronóstico de su enfermedad. El CCRm es un complejo proceso tumoral complejo y heterogéneo en el que la mejor decisión terapéutica está basada en el perfil molecular del tumor. En la actualidad, de los tratamientos dirigidos disponibles para el tratamiento del CCRm, la terapia antiangiogénica combinada con la quimioterapia no dispone de biomarcadores de respuesta al tratamiento validados en la práctica clínica, pudiendo evitar toxicidades y costes innecesarios. Su identificación representaría un gran avance en el manejo terapéutico de estos pacientes candidatos a recibir dicha terapia.



### ***III. HIPÓTESIS***





En pacientes con CCRm que van a recibir tratamiento en primera línea con bevacizumab asociado a la quimioterapia existen biomarcadores plasmáticos y en tejido tumoral relacionados con la respuesta y la supervivencia, implicados en distintas fases del proceso de angiogénesis y la respuesta inmune.



## ***IV. OBJETIVOS***



## **1. OBJETIVO PRINCIPAL**

Analizar la asociación entre la respuesta a la terapia antiangiogénica y los niveles circulantes basales de VEGF-A y ECA en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

## **2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

Determinar si los niveles circulantes de VEGF-A, ECA y galectina-1, -3 y -9 proporcionan información pronóstica y predictiva de la respuesta a la terapia antiangiogénica en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

Analizar la asociación entre el perfil de expresión génica de la respuesta inmune antitumoral y la respuesta a la terapia antiangiogénica en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.



## ***V. POBLACIÓN, DISEÑO Y METODOLOGÍA***

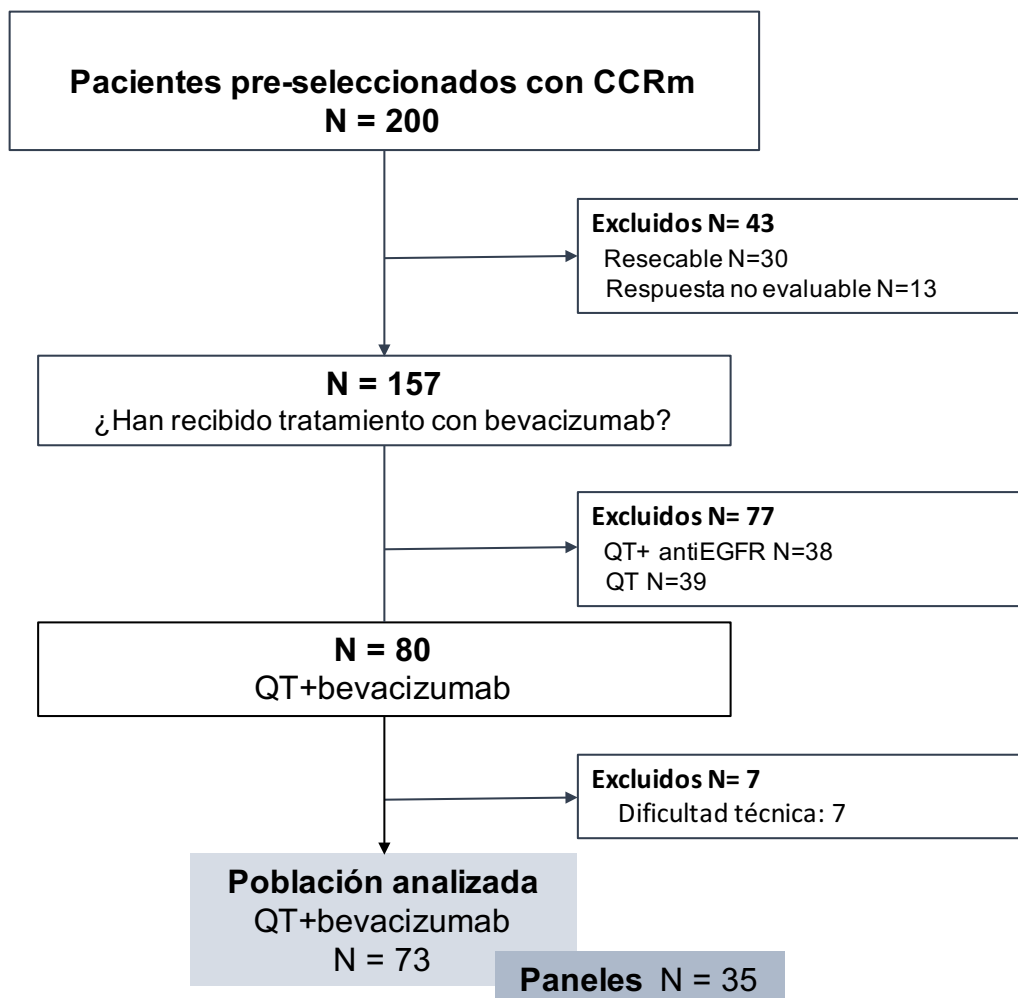




## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y DIAGRAMA DE FLUJO

Es un estudio longitudinal observacional prospectivo en el que fueron incluidos de forma consecutiva un total de 200 pacientes con CCRm previo inicio de tratamiento de primera línea con quimioterapia estándar, en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba entre el 1 de marzo 2017 y el 31 de diciembre de 2020.

A continuación, se representa el diagrama de flujo que ha permitido la selección de nuestra población de estudio. [Figura 8]



**Figura 8.** Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en nuestro estudio.

## 2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La selección de los pacientes se realizó en función de unos criterios de inclusión y de exclusión preestablecidos: [Tabla 4]

**Tabla 4.** Criterios de inclusión y exclusión de la muestra analizada.

<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Edad &gt;18 años.</li><li>- Capacidad para firmar consentimiento informado.</li><li>- Confirmación histológica de CCRm no resecable.</li><li>- ECOG <math>\leq</math>2.</li><li>- Adecuada función hepática, renal y hematológica.</li><li>- Presentar enfermedad medible por criterios RECIST.</li><li>- No haber recibido tratamiento previo para enfermedad avanzada.</li><li>- Indicación de tratamiento de quimioterapia con bevacizumab.</li><li>- Esperanza de vida &gt; 6 meses.</li></ul>
<b>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Segunda neoplasia sincrónica o metacrónica previa a excepción de tumor de piel no melanoma o carcinoma in situ de cervix, correctamente tratado.</li><li>- ECOG&gt;2.</li><li>- Haber recibido tratamiento de quimioterapia para enfermedad metastásica.</li><li>- Enfermedad resecable.</li><li>- No presentar adecuada funcionalidad hepática, renal o medular.</li><li>- Imposibilidad de evaluación de respuesta por criterios RECIST.</li><li>- Indicación de quimioterapia sola +/-antiEGFR</li><li>- No indicación de bevacizumab por hipertensión arterial no controlada y/o proteinuria y/o alto riesgo de sangrado.</li><li>- Imposibilidad en la realización de la determinación de marcadores serológicos.</li><li>- Esperanza de vida &lt; 6 meses.</li></ul>

Los pacientes debían presentar enfermedad medible según los criterios RECIST y la evaluación de la respuesta se realizó, según la práctica clínica, mediante un TAC cada tres meses y/o seis ciclos desde el inicio de la terapia. El tratamiento se continuó hasta la progresión de la enfermedad, la decisión del paciente y/o la aparición de una toxicidad inaceptable que contraindicara la terapia.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (España) (nº 260, ref. 3404), de acuerdo con los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki de 1964 y sus modificaciones posteriores.

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado de forma previa a la inclusión en el estudio y a la extracción de las muestras

### **3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES**

Se realizó una revisión de las historias clínicas de los pacientes incluyendo en la hoja individual de recogida de datos los correspondientes a datos de filiación, características del paciente, características del tumor y características del tratamiento recibido. **[Tabla 5]** El tratamiento de los datos se realizó de acuerdo con la normativa vigente del RD 223/2004 de 6 de febrero y la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre sobre la protección de datos de carácter personal.

Las características clínico-patológicas analizadas fueron la edad, el sexo, el estadio, la localización del tumor, el grado de diferenciación tumoral, el tipo de tumor histológico, el estado mutacional RAS y BRAF, el estado de microsatélite, el número de localizaciones metastásicas, el tratamiento quimioterápico de primera línea recibido, la duración del tratamiento, la evaluación de la respuesta y el grado de toxicidad. La toxicidad se evaluó a lo largo del estudio de acuerdo con los Criterios Comunes de

Toxicidad del Instituto Nacional del Cáncer (NCI). Para evaluar la respuesta a los tratamientos, nos basamos en los criterios RECIST 1.1 (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*): respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), progresión de la enfermedad (PE) y enfermedad estable (EE). **[Tabla 2 en el Anexo I]**

A partir de los datos obtenidos se elaboraron variables para relacionarlas con la respuesta y la supervivencia: tasa de respuestas globales (TR) que hace referencia a la suma de RC, RP y EE; supervivencia global (SG), que abarca desde la fecha del inicio de tratamiento con bevacizumab hasta la fecha de la última visita en los pacientes no fallecidos y la fecha de *exitus* para los fallecidos; supervivencia libre de progresión (SLP) que comprende desde el inicio de tratamiento con quimioterapia combinada con bevacizumab hasta el fin del mismo, por progresión de la enfermedad y/o toxicidad inaceptable y/o suspensión del tratamiento por otra causa. **[Tabla 5]**

***Tabla 5 Variables incluidas en la recogida de datos clínicos, patológicos, moleculares y tratamientos recibidos de los pacientes incluidos en el estudio.***

<b>DATOS DE FILIACIÓN</b>
- Iniciales - Número de codificación del paciente
<b>CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE</b>
- Fecha de nacimiento - Sexo: mujer/hombre - Peso (kg) - Talla (cm) - ECOG al diagnóstico: 0/1/2 - HTA previo al diagnóstico: si/no - Fecha del diagnóstico de enfermedad metastásica

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Edad al diagnóstico de enfermedad metastásica</li> <li>- Enfermedad metastásica: sincrónica/metacrónica</li> </ul>
<p><b>CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Localización del primario: derecho/izquierdo</li> <li>- Tipo histológico: Adenocarcinoma/mucinoso/célula anillo sello</li> <li>- Grado histológico: Gx: grado histológico desconocido/Grado 1: bien diferenciado/Grado 2: moderadamente diferenciado/Grado 3: pobremente diferenciado</li> <li>- Localización metastásica: hígado/pulmón/hígado y pulmón/peritoneo/otros</li> <li>- Número de localizaciones metastásicas: &lt;2/≥2</li> <li>- Mutación de KRAS: mutado/wild type/desconocido</li> <li>- Mutación de NRAS: mutado/wild type/desconocido</li> <li>- Mutación RAS: mutado/wild type/desconocido.</li> <li>- Mutación BRAF: mutado/wild type/desconocido.</li> <li>- Microsatélites: inestable/estable/desconocido.</li> </ul>
<p><b>CARACTERÍSTICAS DEL TRATAMIENTO RECIBIDO</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cirugía tumor primario: si/no</li> <li>- QT adyuvante: si/no</li> <li>- Esquema de quimioterapia primera línea: FOLFOX+bevacizumab/FOLFIRI+bevacizumab/FP+bevacizumab/Irinotecan+bevacizumab.</li> <li>- Fecha inicio primera línea de quimioterapia</li> <li>- Fecha fin primera línea de quimioterapia</li> <li>- Tipo de respuesta primera línea de quimioterapia: Respuesta completa/Respuesta parcial/Enfermedad estable/Progresión.</li> <li>- Toxicidad grado 3-4 primera línea de quimioterapia: si/no</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"><li>- Tipo de toxicidad grado 3-4: digestiva/medular/mucositis/neurotoxicidad</li><li>- Progresión a tratamiento de primera línea: si/no</li><li>- Fecha progresión primera línea de quimioterapia.</li><li>- Tiempo de respuesta: &lt;6 meses/ ≥6 meses</li><li>- Tiempo de respuesta: &lt;9 meses/ ≥9 meses</li><li>- Esquema de quimioterapia de segunda línea: si/no</li><li>- Número de líneas recibidas: 1/2/3/&gt;3</li></ul>
<b>FIN DEL SEGUIMIENTO</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Fecha de <i>exitus</i>/última visita</li><li>- <i>Exitus</i>: si/no</li><li>- Causa del <i>exitus</i>: progresión/toxicidad/desconocido</li></ul>
<b>BIOMARCADORES ANALIZADOS</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>-VEGF-A (ng/mL)</li><li>-ECA (ng/mL)</li><li>-Galectina-1 (ng/mL)</li><li>-Galectina-3 (ng/mL)</li><li>-Galectina-9 (ng/mL)</li><li>-Panel de expresión génica relacionado con la respuesta inmune anti-tumoral.</li></ul>

#### 4. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES

Se realizó un seguimiento de todos los sujetos del estudio, tomando como fecha inicial el primer día de inicio de tratamiento de quimioterapia de primera línea y la extracción de las muestras de plasma del primer paciente. Y como fecha fin del estudio se estableció al menos, a los seis meses de seguimiento del último paciente incluido,

especificando en cada uno la situación de progresión o no a la primera línea de quimioterapia y si los pacientes se encontraban vivos o no.

## **5. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y SEPARACIÓN DE PLASMA**

Los pacientes con CCRm fueron sometidos a una extracción de sangre antes de recibir cualquier tratamiento oncológico para enfermedad metastásica que incluyera bevacizumab, en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Reina Sofía (Córdoba). El plasma se obtuvo a partir de 8 mL de sangre recogida en tubos de K2-EDTA. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C para separar el plasma. A continuación, las muestras de plasma se alicuotaron en tubos eppendorf para evitar los ciclos de congelación-descongelación y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

## **6. ANÁLISIS DE MARCADORES CIRCULANTES EN PLASMA**

La medición de los diferentes biomarcadores en plasma se realizó utilizando los siguientes kits: Kit ELISA de VEGF-A humano (ref: BMS277-2, Invitrogen); Kit ELISA de ECA humano (ref: ab119577, Abcam); Kit ELISA de Galectina-1 humana (ref: ELH-GALECTIN-1, RayBioTech); Kit ELISA de Galectin-3 humana (ref: BMS279-4, Invitrogen) y Kit ELISA de Galectina-9 humana (ref: ELH-GALECTIN-9, RayBioTech). En cada caso, el análisis se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

A partir de las determinaciones serológicas, y dado que no se dispone de puntos de corte estandarizados a nivel plasmático de los marcadores analizados, se decidió

realizar el análisis estadístico estratificando los parámetros por sus terciles (T1, T2 y T3) en la población analizada.

## **7. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA INMUNE EN LOS TUMORES**

De los 73 pacientes analizados en nuestro estudio con CCRm que han recibido tratamiento con bevacizumab asociado a la quimioterapia, se seleccionaron 35 pacientes para un análisis exploratorio de determinación de expresión génica de los que disponíamos de adecuado material de tejido tumoral parafinado para la posterior extracción de ARN.

Los perfiles de expresión génica inmune en los tumores se realizaron con el panel nCounter PanCancer Immune Profiling de NanoString en un equipo NanoString nCounter DX (Nanostring Technologies, Seattle, EE. UU.). Para cada muestra de tumor parafinado, se extrajo el ARN total utilizando el Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, se cuantificó el ARN total con el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technology) y se midió el número de integridad del ARN (RIN) con el equipo Agilent 2200 TapeStation. Los datos de expresión en bruto generados para cada gen se normalizaron y analizaron utilizando el software nSolver (NanoString Technologies). Para cada gen, la expresión positiva o negativa indica que el número de moléculas de ARN está por encima o por debajo, respectivamente, de la media en el conjunto de muestras.



## 8. VARIABLE PRINCIPAL

Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de los niveles de expresión plasmática de VEGFA, ECA y galectinas -1, -3 y -9 sobre la SLP y la SG en pacientes con CCRm que reciben tratamiento de quimioterapia con bevacizumab.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se compararon mediante las pruebas de chi-cuadrado/exacta de Fisher. Las variables cuantitativas se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney. La asociación con la supervivencia se analizó mediante curvas de Kaplan-Meier y la prueba de log-rank. Los análisis multivariantes para la SG y la SLP se realizaron mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox, ajustando por edad, sexo, ECOG en el momento del diagnóstico, estado RAS, localización del tumor primario y número de localizaciones metastásicas.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics para Macintosh (versión 20.0. Armonk, NY: IBM Corp). El nivel de significación para todos los análisis fue de  $\alpha=0,05$ . El análisis de la firma de genes inmunitarios de muestras clínicas se realizó utilizando los datos normalizados de nCounter nanoString y el software en línea Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

Se han elaborado gráficos y tablas que facilitan la interpretación de los resultados obtenidos.

Para el cálculo del tamaño muestral de nuestro estudio, se ha tenido en cuenta que para la cohorte de pacientes tratados en primera línea con bevacizumab asociado a quimioterapia se estima una mediana de tiempo a la progresión de 9-10 meses, según los datos de estudios previos (67, 76). Con unas diferencias esperadas de SLP del 30%

si se aplican en esta cohorte los factores predictivos de respuesta, utilizando un error alfa del 0,05 y un error beta del 0,2, sería necesario analizar 72 pacientes.

## **10. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Para la obtención de la bibliografía pertinente se usó la base de datos *PUBMED* y el motor de búsqueda *MEDLINE* ofrecidos por la Biblioteca nacional de los Estados Unidos (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Se empleó a su vez el proveedor de información *Ovid Technologies* al que se accede a través del *Ovid Web Gateway* (<https://ovidsp.ovid.com>). Se accedió a estas plataformas junto con la consulta directa de determinadas revistas científicas a través de la *Biblioteca Virtual del Servicio de Salud Público de Andalucía* (<http://www.bvsspa.es/profesionales/>).

Las referencias se muestran según el estilo *Vancouver* para la publicación de manuscritos en el ámbito de las Ciencias de la Salud.

## ***VI. RESULTADOS***



## 1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES

Desde marzo de 2017 hasta diciembre de 2020, se examinaron 200 pacientes con confirmación histológica de cáncer colorrectal metastásico antes del inicio del tratamiento estándar de quimioterapia de primera línea que incluía bevacizumab para determinar su elegibilidad y finalmente se incluyeron 73 pacientes en el presente estudio (véase la **Figura 8**). La mediana del seguimiento de los pacientes fue de 19 meses (IC 95%: 17,2-21,3 meses).

La mediana de edad fue de 62 años (35-87), siendo la mayoría hombres (60,3%). La histología más frecuente fue el adenocarcinoma (87,7%) y con grado de diferenciación moderado (86,6%). En el momento del diagnóstico, 62 pacientes (84,9%) eran estadio IV y 10 (12,7%) desarrollaron metástasis durante el seguimiento, siendo el hígado la localización más frecuente (45,2%). Un total de 16 (21,9%) pacientes presentaban metástasis pulmonares y 9 (12,3%) en localización peritoneal.

Treinta y un pacientes (42,5%) fueron operados del tumor primario y del total, el 64,4% tenían localización del tumor primario en el lado derecho y el 35,5% del lado izquierdo. ECOG 0 y 1 estaba presente al diagnóstico en 44 (60,3%) y en 28 (38,4%) pacientes, respectivamente.

Dentro de las características moleculares, 59 pacientes (80,8%) tenían un estado RAS mutado y 65 (89%) tenían microsatélites estables. El régimen de quimioterapia más utilizado fue el basado en oxaliplatino asociado a bevacizumab (91,7%), 40 pacientes (54,8%) tuvieron una respuesta parcial y 29 (39,7%) estabilización de la enfermedad. En el momento del análisis, 62 pacientes (84,9%) habían progresado a primera línea y 48 (65,8%) habían fallecido.

Las características basales clínicas, patológicas, moleculares y los tratamientos recibidos de los pacientes de nuestro estudio se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Características basales de la población de estudio (n=73).

Características basales (N)	Valor	n (%)
Edad	Mediana (rango)	62 (35-87)
Género	Masculino	44 (60,3)
	Femenino	29 (39,7)
Localización	Derecho	26 (35,6)
	Izquierdo	47 (64,4)
Estadio al diagnóstico	Precoz	10 (12,7)
	Avanzado	63 (87,3)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	64 (87,7)
	Mucinoso/Anillo de sello	9 (12,4)
Grado histológico	Bien diferenciado	9 (12,3)
	Moderadamente diferenciado	61 (86,6)
	Pobrememente diferenciado	3 (4,1)
Cirugía del tumor primario	Si	31 (42,5)
	No	42 (57,5)
ECOG al diagnóstico	0	44 (60,3)
	1	29 (39,8)
Número de metástasis	≤2	56 (76,7)
	>2	17 (23,3)
Metástasis hepáticas	Si	33 (45,2)
	No	40 (54,8)
Metástasis pulmonares	Si	16 (21,9)
	No	57 (78,1)
Metástasis peritoneales	Si	9 (12,3)
	No	64 (87,7)
Estado RAS	Mutado	59 (80,8)
	No mutado	13 (17,8)
	Desconocido	1 (1,4)
Estado BRAF	Mutado	5(6,8)
	No mutado	15(20,5)
	Desconocido	53(72,6)
Estado Microsatelites	MSS	65(89)
	MSI-H	2 (2,7)
	Desconocido	6 (8,2)
Quimioterapia primera línea	Folfox/Xelox-BVZ	63 (86,3)
	Folfiri-BVZ	3 (4,1)
	Folfoxiri-BVZ	4 (5,5)

	Capecitabina-BVZ	3 (4,1)
Respuesta primera línea	Respuesta parcial	40 (54,8)
	Enfermedad estable	29 (39,7)
	Progresión	4 (5,5)
Toxicidad grado $\geq 2$	Si	21 (28,8)
	No	52 (71,2)
Hipertensión arterial	No	52 (71,2)
	Grado 1-2	17 (23,3)
	Grado 3	4 (5,5)
Quimioterapia segunda línea	Si	47 (64,4)
	No	26 (35,6)
Progresión primera línea	Si	62 (84,9)
	No	11 (15,1)
Exitus	Si	48 (65,8)
	No	25 (34,2)

Los puntos de corte utilizados, según los terciles poblacionales, para el VEGF-A, ECA, gal -1, gal -2 y gal-3 se encuentra representados en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Puntos de cortes utilizados para el análisis de los marcadores según los terciles de VEGF-A, ECA, galectina -1, galectina -3 y galectina -9.

	VEGFA (ng/mL)	ECA (ng/mL)	Gal-1 (ng/mL)	Gal-3 (ng/mL)	Gal-9 (ng/mL)
<b>T1</b>	<0,1689	<79,48	<28,36	<15,14	<14,33
<b>T2</b>	0,1689-0,4407	79,48-141,85	28,36-48,82	15,14-23,31	14,33-17,05
<b>T3</b>	>0,4407	>141,85	> 48,82	>23,31	>17,05

Abreviatura: Gal-: galectina; T1: tercil 1; T2: tercil 2; T3: tercil 3.

En la **Tabla 8 y 9** se describen las características basales de los pacientes, relacionando los niveles basales circulantes en terciles de las determinaciones serológicas con las

variables clinicopatológicas. No se observaron resultados estadísticamente significativos para las variables género (masculino/femenino), edad (<60 años/≥60 años), localización del tumor primario (derecha/izquierda), estado mutacional de RAS (mutado/no mutado/desconocido), ECOG al diagnóstico (0/1/2), o el número de localizaciones metastásicas (única/múltiple).

**Tabla 8.** Características basales de la población de estudio y su relación con los niveles circulantes en terciles de VEGF-A y ECA.

	VEGF-A			p	ECA			p
	T1	T2	T3		T1	T2	T3	
<b>Género</b>								
Masculino	19	11	12	0,058	14	14	16	0,727
Femenino	5	12	11		11	10	8	
<b>Edad</b>								
≥60 años	6	8	12	0,150	9	9	10	0,915
<60 años	18	15	11		16	15	14	
<b>Localización tumor primario</b>								
Izquierda	15	14	16	0,807	17	16	14	0,748
Derecha	9	9	7		8	8	10	
<b>RAS</b>								
Mutado	20	19	19	0,936	23	17	19	0,156
Wild type	4	4	3		2	7	4	
<b>ECOG al diagnóstico</b>								
0-1	15	14	14	0,991	13	15	16	0,556
>1	9	9	9		12	9	8	
<b>Número metastasis</b>								
Único	19	19	15	0,345	18	19	19	0,790
Múltiple	5	4	8		7	5	5	

Abreviaturas: T1: tercil 1; T2: tercil 2; T3: tercil 3.



**Tabla 9.** Características basales de la población de estudio y su relación con los niveles circulantes en terciles de Galectinas -1, -3 y -9.

	Galectina-1				Galectina-3				Galectina-9			
	T1	T2	T3	p	T1	T2	T3	p	T1	T2	T3	p
<b>Género</b>												
Masculino	18	14	12		16	16	12		14	12	18	
Femenino	6	10	11	0,15	9	8	12	0,44	11	12	6	0,18
<b>Edad</b>												
≥60 años	8	12	8		10	8	10		8	12	8	
<60 años	16	12	15	0,42	15	16	14	0,82	17	12	16	0,35
<b>Localización tumor primario</b>												
Izquierda	17	15	13		15	17	15		16	16	15	
Derecha	7	9	10	0,59	10	7	9	0,71	9	8	9	0,95
<b>RAS</b>												
Mutado	18	18	21		22	18	19		22	19	18	
Wild type	5	6	2	0,31	3	5	5	0,62	3	4	6	0,49
<b>ECOG al dco</b>												
0-1	13	17	13		14	13	17		15	14	15	
>1	11	7	10	0,44	11	11	7	0,43	10	10	9	0,95
<b>Núm. metastasis</b>												
Único	17	18	19		18	17	21		19	19	18	
Múltiple	7	6	4	0,63	7	7	3	0,31	6	5	6	0,93

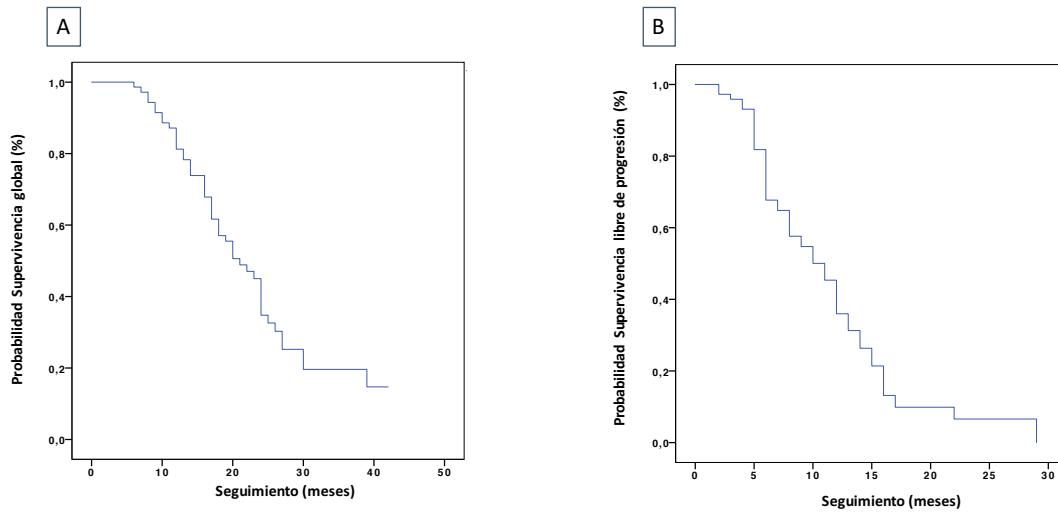
Abreviaturas: dco: diagnóstico; Num.: número; T1: tercil 1; T2: tercil 2; T3: tercil 3.

## 2. ASOCIACIÓN ENTRE SUPERVIVENCIA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

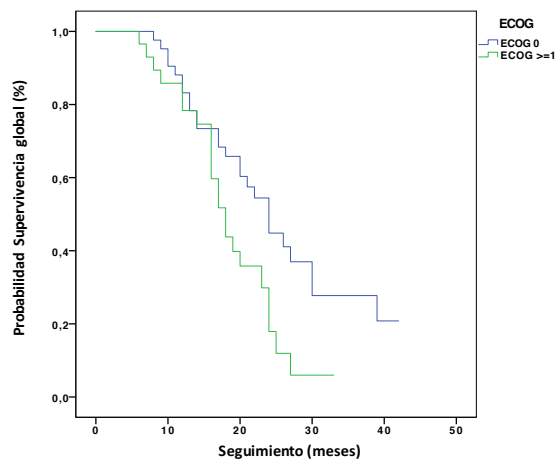
En nuestra población, la mediana de SG en el momento del análisis fue de 21 meses (IC 95% 16,3-25,3 meses), siendo la probabilidad de SG a los 12 y 24 meses del 75.3% y del 23.3%, respectivamente. La mediana de SLP fue de 11 meses (IC 95% 8,8-13,1 meses), con tasas del 79,5% a los 6 meses y del 54,8% a los 9 meses. **[Figura 9]**

Al correlacionar la SG con las características clínico-patológicas como género, edad, número de localizaciones metastásicas, estado mutacional RAS y ECOG, encontramos relación estadísticamente significativa con la variable ECOG 0 y ≥1 (24 meses; IC 95%

20,1-27,8 meses vs 18 meses; IC95% 15,6-20,3;  $p=0,021$ ). [Figura 10] En términos de SLP no obtuvimos en ninguna de las variables analizadas relación con significación estadística ( $p>0,05$ ).



**Figura 9.** (A) Supervivencia global en la población analizada de CCRm. (B) Supervivencia libre de progresión en la población analizada de CCRm.



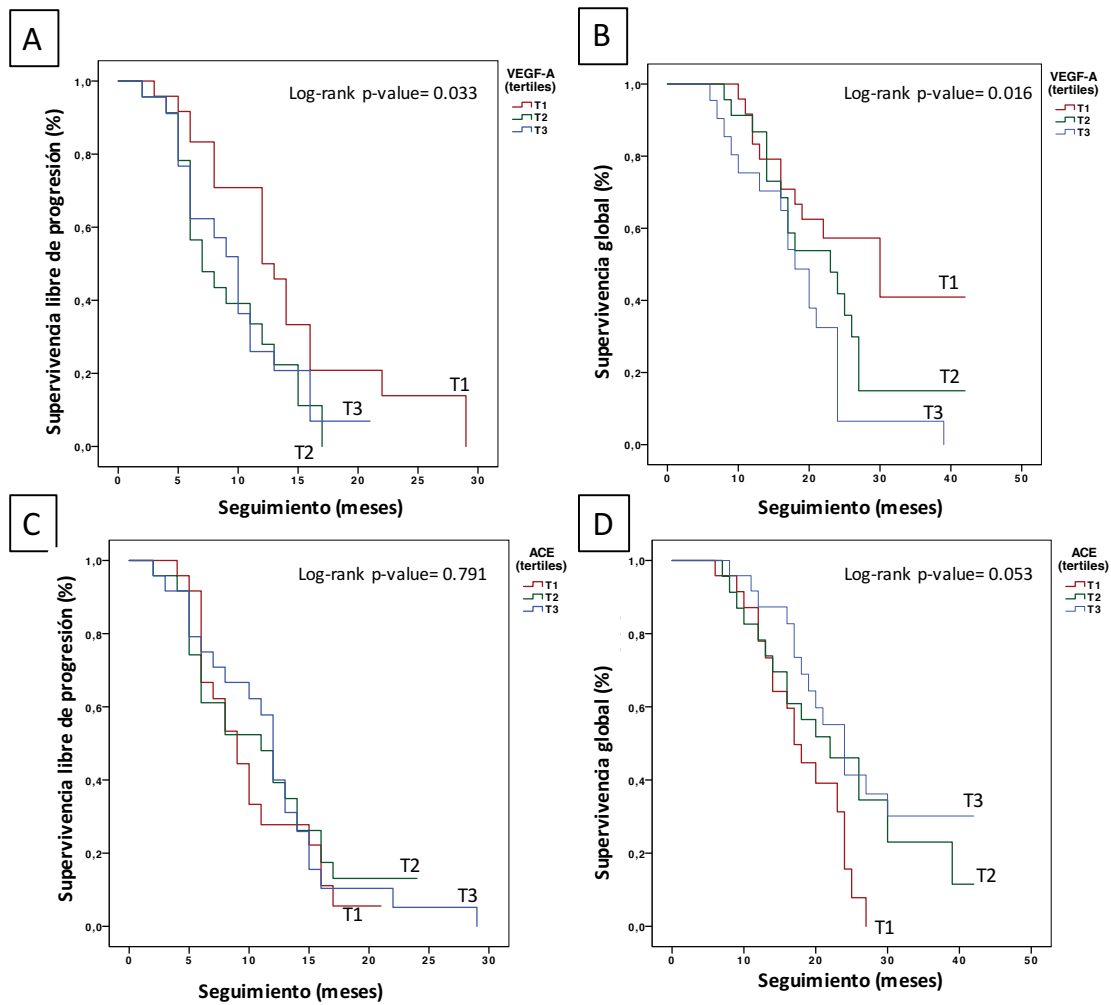
**Figura 10.** Análisis de supervivencia global en la muestra de CCRm en función del estado funcional ECOG.

### 3. SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LOS TERCILES DE VEGF-A Y ECA

En relación con los niveles plasmáticos de VEGF-A previo inicio de tratamiento con quimioterapia asociada a bevacizumab, con una mediana de seguimiento de 9 meses (IC 95% 8,9-11,6), la mediana de supervivencia libre de progresión en T1 (<0,1689ng/mL) fue de 14,1 meses (IC 95% CI 11-17,2), en T2 fue de 9,1 meses (IC 95% CI 7,2-11) y en T3 fue de 9,7 meses (IC 95% CI 7,6-11,9); (long rank p=0,033).

**[Figuras 11.A]** Por otro lado, la mediana de supervivencia global fue de 28,5 meses (IC 95% 23,2-33,8), 22,6 meses (IC 95% 18,1-27,1) y 18,3 meses (IC 95% 14,6-22,1) para los terciles T1, T2 y T3 respectivamente; (long rank p=0,016). **[Figura 11.B]**

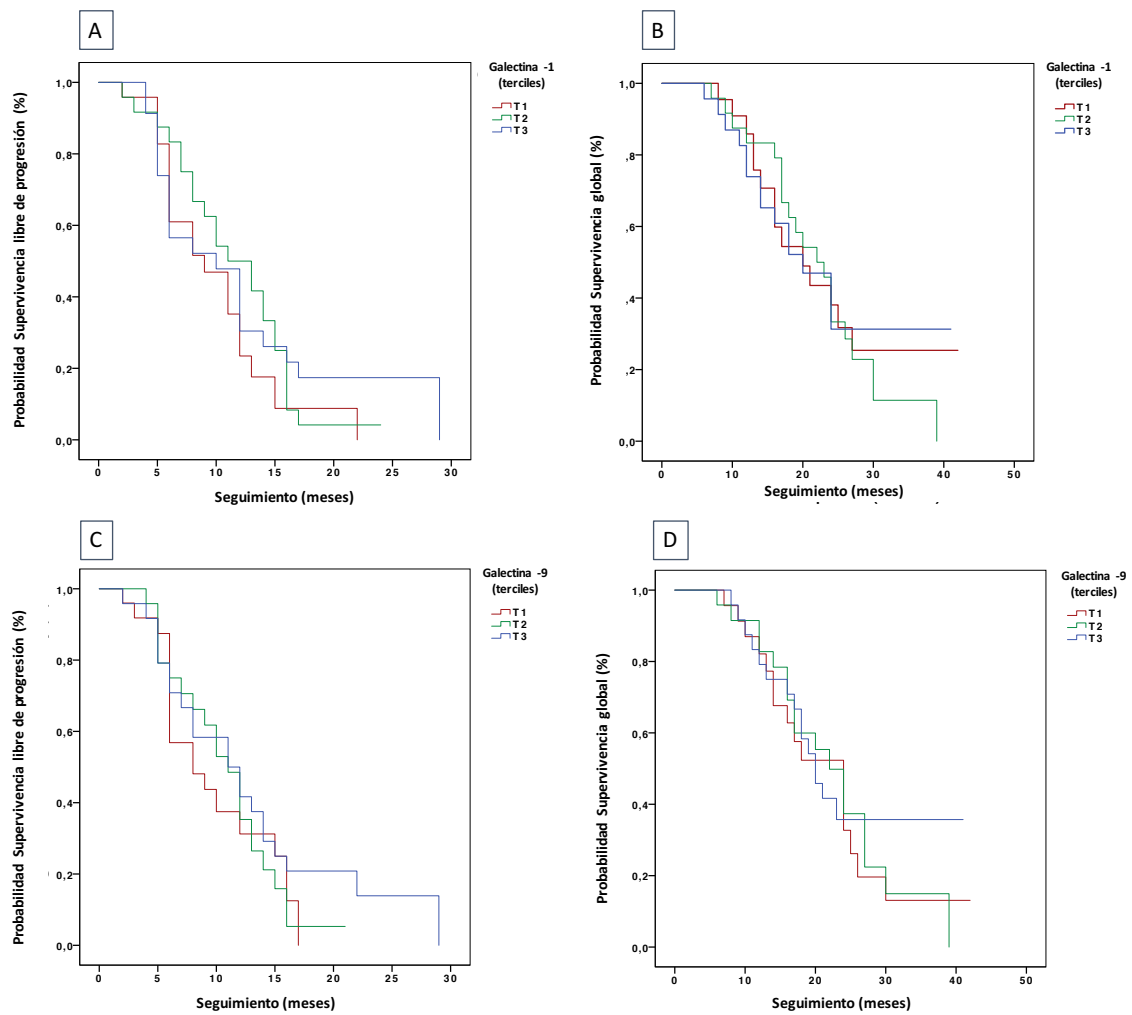
No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de SLP según los terciles de ECA. **[Figura 11.C]** Sin embargo, el grupo de pacientes con determinaciones de ECA en el tercil superior (>141,86ng/ml) presentó una mediana de supervivencia global de 26,37 (IC 95% 21,5-31,17), mientras que en el tercil medio fue 23,3 meses (IC 95% 18-28,6) y en el tercil inferior fue 18,1 meses (IC 95% 15,5-20,7); (long rank p=0,053). **[Figura 11.D]**

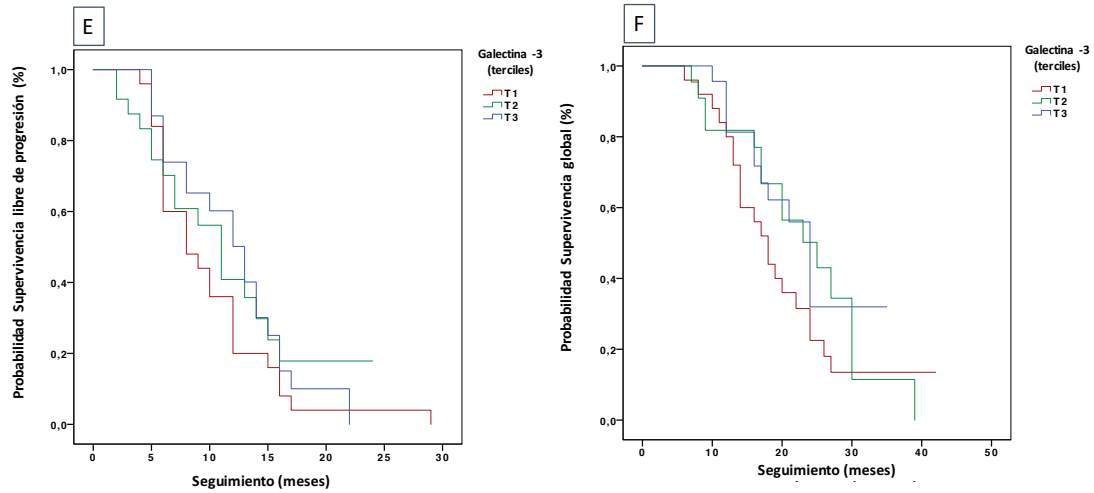


**Figura 11.** Supervivencia global y supervivencia libre de progresión según los niveles plasmáticos basales de VEGF-A y ECA en la primera línea de tratamiento con bevacizumab de los pacientes con CRCm. (A) Asociación entre los niveles basales de VEGF-A y la SLP. (B) Asociación entre los niveles basales de VEGF-A y la SG. (C) Asociación entre los niveles basales de ECA y la SLP. (D) Asociación entre los niveles basales de ECA en plasma y la SG. Abreviaturas: VEGF-A: factor del crecimiento vascular endotelial, ECA: enzima convertidora de angiotensina. T1: tercil superior, T2, tercil intermedio, T3 tercil inferior.

#### 4. SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LOS TERCILES DE GALECTINAS-1, -3 Y -9

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los terciles de galectinas -1, -3 y -9 en SG ni SLP (ambas, valor de  $p > 0,05$ ). [Figura 12]





**Figura 12.** Tasas de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) según los niveles plasmáticos basales de galectina -1, galectina -3 y galectina -9 en la primera línea de tratamiento con bevacizumab de los pacientes con CCRm. (A) Asociación entre los niveles basales de galectina -1 y la SLP. (B) Asociación entre los niveles basales de galectina -1 y la SG. (C) Asociación entre los niveles basales de galectina -9 y la SLP. (D) Asociación entre los niveles basales de galectina -9 en plasma y la SG. (E) Asociación entre los niveles basales de galectina -3 en plasma y la SLP. (F) Asociación entre los niveles basales de galectina -3 en plasma y la SG. Abreviaturas: SG: supervivencia global, SLP: supervivencia libre de progresión. T1: tercil superior, T2, tercil intermedio, T3 tercil inferior.

## 5. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN INCLUYENDO TERCILES DE VEGF-A Y ECA

Los valores de VEGF-A (ng/mL) se mantuvieron como factor pronóstico (supervivencia global: T3 vs. T1: HR=4,28, IC 95% 1,83-10; p=0,001) y predictivo (supervivencia libre de progresión: T2 vs T1: HR=2,15, IC 95% 1,01-4,54; p=0,045; T3 vs T1: HR=2,64, IC 95% 1,21-5,65; p=0,014) independiente en el análisis multivariante ajustado por otros factores pronóstico (género, edad, ECOG, estado RAS, localización tumor primario y número de localizaciones metastásicas). [Tabla 10]

**Tabla 10.** Análisis multivariante de la SG y la SLP incluyendo los terciles de VEGF-A.

Variables	SG		SLP	
	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)	p
<b>VEGF-A</b>				
VEGF-A T1	1 (ref.)		1(ref.)	
VEGF-A T2	1,90 (0,85-4,30)	0,124	2,15 (1,02-4,54)	0,045
VEGF-A T3	4,28 (1,83-10,0)	0,001	2,64 (1,21-5,65)	0,014
<b>Género</b>	0,60 (0,31-1,16)	0,130	1,12 (0,64-1,96)	0,685
<b>Edad</b>	1,01 (0,97-1,05)	0,534	0,99 (0,96-1,02)	0,615
<b>ECOG</b>				
0	1(ref.)		1(ref.)	
1	2,32 (1,22-4,42)	0,010	2,11 (1,16-3,83)	0,014
<b>Estado RAS</b>	0,92 (0,40-2,11)	0,843	0,86 (0,43-1,71)	0,665
<b>Localización</b>				
Derecha	1(ref.)		1(ref.)	
Izquierda	0,33 (0,17-0,65)	0,001	0,60 (0,33-1,12)	0,018
<b>Núm. metástasis</b>	0,75 (0,36-1,55)	0,430	0,77 (0,39-1,50)	0,439

Igualmente, en el análisis de regresión de Cox multivariante, ajustando por factores pronósticos (género, edad, ECOG, estado RAS, localización tumor primario y número de localizaciones metastásicas), los valores plasmáticos de ECA (ng/mL) permanecieron como factor pronóstico independiente de supervivencia global (HR= 0,44, IC95% 0,21-0,93, p= 0,032). [Tabla 11]

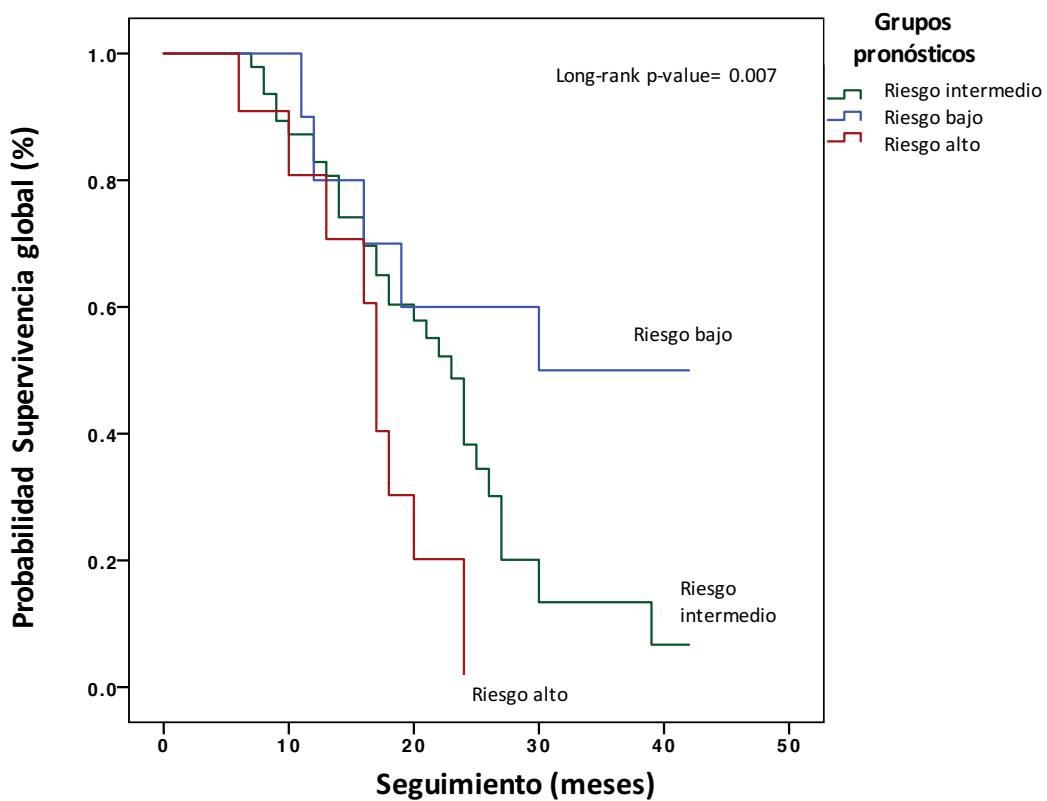
**Tabla 11.** Análisis multivariante de la SG y la SLP incluyendo los tectiles de ECA.

Variables	SG		SLP	
	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)	p
<b>ECA</b>				
<b>ECA T1</b>	1 (ref.)		1 (ref.)	
<b>ECA T2</b>	0,69 (0,33-1,47)	0,339	0,98 (0,51-1,89)	0,952
<b>ECA T3</b>	0,44 (0,21-0,93)	0,032	0,95 (0,50-1,80)	0,879
<b>Género</b>	0,67 (0,35-1,29)	0,231	1,05 (0,60-1,84)	0,863
<b>Edad</b>	0,99 (0,96-1,02)	0,523	0,98 (0,95-1,01)	0,075
<b>ECOG</b>				
<b>0</b>	1(ref.)		1(ref.)	
<b>1</b>	2,14 (1,12-4,07)	0,021	1,97 (1,09-3,58)	0,025
<b>Estado RAS</b>	0,96 (0,42-2,20)	0,920	1,06 (0,55-2,06)	0,862
<b>Localización</b>				
<b>Derecha</b>	1(ref.)		1(ref.)	
<b>Izquierda</b>	0,44 (0,23-0,84)	0,013	0,71 (0,39-1,23)	0,264
<b>Núm. metástasis</b>	0,82 (0,49-1,73)	0,608	0,94 (0,49-1,81)	0,848



## 6. GRUPOS PRONÓSTICO DE RIESGO EN FUNCIÓN DE LOS TERCILES DE VEGF-A Y ECA

Se definieron tres grupos de riesgo pronóstico entre los pacientes incluidos en este estudio, de acuerdo con los terciles de ECA y VEGF-A: alto riesgo (T1 ECA y T3 VEGF-A), riesgo intermedio (T2 ECA y T2 VEGF-A) y bajo riesgo (T3 ECA y T1 VEGF-A). Los pacientes con alto riesgo presentaron una menor supervivencia global media comparados con los pacientes con bajo riesgo (16,6 meses (IC95% 13,2-20,0) vs 29,8 (IC95% 21,7-37,9),  $p=0,007$ ). [Figura 13]



**Figura 13.** Análisis de la SG en primera línea de tratamiento de pacientes con CCRm con quimioterapia combinada con bevacizumab según los niveles plasmáticos estratificados por terciles de VEGF-A y ECA basales. Riesgo alto (ECA T1 y VEGF-A T3), riesgo intermedio (ECA T2 y VEGF-A T2) y riesgo bajo (ECA T3 y VEGF-A T1).

## 7. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE GRUPOS PRONÓSTICOS

Se realizó a continuación un análisis de la relación de las características basales de los pacientes incluidos en el estudio en función de los grupos pronósticos de riesgo establecidos (bajo, intermedio y alto), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Destacamos que, las características de los grupos extremos se encuentran bien balanceadas, aunque el mayor número de pacientes está en el riesgo intermedio ( $n = 48$ ). A continuación, se presenta una tabla con dichas características clínicopatológicas. [Tabla 12]

**Tabla 12.** Características de los pacientes en función de los grupos pronósticos establecidos (alto, intermedio, bajo)

Características de los pacientes (N)	Bajo riesgo (n=11)	Riesgo intermedio (n=48)	Alto riesgo (n=14)	p valor
<b>Edad</b>	59(49-68)	63(60-66)	59(53-65)	0,237
<b>Género</b>				
Masculino	9	27	8	0,284
Femenino	2	21	6	
<b>Localización</b>				
Derecho	6	16	4	0,345
Izquierdo	5	32	10	
<b>Tipo histológico</b>				
Adenocarcinoma	9	42	13	0,856
Mucinoso/Anillo sello	2	6	1	
<b>Cirugía tumor primario</b>				
Si	5	20	8	0,634
No	3	24	6	
<b>ECOG al diagnóstico</b>				
0	8	28	8	0,655
1	3	20	6	

<b>Número de localizaciones metastásicas</b>				
≤2	9	38	9	0,465
>2	2	10	5	
<b>Estado RAS</b>				
Mutado	9	37	13	0,483
Wild Type	2	10	1	
<b>Estado BRAF</b>				
Mutado	0	5	0	0,568
Wild Type	2	10	3	
Desconocido	9	33	11	
<b>Respuesta primera línea</b>				
Parcial	5	26	9	0,802
Enfermedad estable	5	19	5	
Progresión	1	3	0	
<b>Progresión a primera línea</b>				
Si	11	40	11	0,288
No	0	8	3	
<b>Exitus</b>				
Si	6	31	11	0,435
No	5	17	3	

## 8. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE SUPERVIVENCIA GLOBAL EN FUNCIÓN DE LOS GRUPOS PRONÓSTICOS DE VEGFA y ECA

Los valores plasmáticos de VEGF-A y ECA estableciendo grupos de riesgo (T1, T2 y T3) se mantuvieron como factor pronóstico independiente (SG: HR 0,14, IC9% 0,04-0,47,  $p < 0,001$ ) en el análisis multivariante ajustado por otros factores pronóstico conocidos (género, edad, ECOG, estado RAS, localización tumor primario y número de localizaciones metastásicas). [Tabla 13]

**Tabla 13.** Análisis multivariante de la SG y la SLP incluyendo los grupos pronósticos de riesgo.

Variables	SG		SLP	
	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)	p
<b>Grupo pronóstico</b>				
<b>Alto</b>	1 (ref.)		1 (ref.)	
<b>Intermedio</b>	0,46 (0,20-1,01)	0,054	0,79 (0,37-1,68)	0,541
<b>Bajo</b>	0,14 (0,04-0,47)	0,001	0,56 (0,23-1,50)	0,246
<b>Género</b>	0,60 (0,31-1,81)	0,140	1,04 (0,59-1,83)	0,881
<b>Edad</b>	0,99 (0,96-1,04)	0,915	0,98 (0,95-1,01)	0,115
<b>ECOG</b>				
<b>0</b>	1(ref.)		1(ref.)	
<b>1</b>	2,24 (1,19-4,27)	0,014	2,01 (1,20-3,63)	0,021
<b>Estado RAS</b>	1,03 (0,42-2,49)	0,955	0,88 (0,44-1,78)	0,733
<b>Localización</b>				
<b>Derecha</b>	1 (ref.)			
<b>Izquierda</b>	0,36 (0,19-0,71)	0,003	0,64 (0,35-1,18)	0,152
<b>Núm. metástasis</b>	0,78 (0,36-1,64)	0,514	0,91 (0,47-1,76)	0,782

## 9. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADA CON LA RESPUESTA INMUNE

A continuación, se exploró en los pacientes la relación entre una respuesta más duradera con el tratamiento de bevacizumab asociado a la quimioterapia, definido como SLP $\geq$ 9 meses y el microambiente inmune tumoral. Para ello, del total de 73 pacientes, se seleccionaron 35 de los que se disponía de suficiente material parafinado para su

análisis mediante paneles de expresión génica de respuesta inmune antitumoral (nCounter® PanCancer Immune Profiling).

Como se representa en la **Figura 14**, se encontraron 45 genes cuya expresión diferencial distinguía entre los grupos de pacientes con  $\geq 9$  meses de SLP (largos respondedores) y aquellos con  $< 9$  meses de SLP (cortos respondedores) a la terapia con bevacizumab asociada a la quimioterapia. En el análisis supervisado utilizando un valor  $p < 0,05$  como punto de corte, de los 740 genes analizados, 10 genes (PECAM1, PPARG, TAL1, FEZ1, JAM3, CCR1, MCAM, CDH5, FCGR1A y TNFRSF11B) fueron identificados como expresados diferencialmente con significación estadística entre las muestras de los pacientes con SLP  $\geq 9$  meses y SLP  $< 9$  meses. [**Tabla 13**]

Concretamente, los pacientes con SLP  $\geq 9$  meses a la terapia con bevacizumab asociado a la quimioterapia, se caracterizaron por presentar expresión más alta de los genes PECAM1, TAL1, FEZ1, JAM3, CCR1, MCAM y CDH5, mientras que las muestras de los pacientes con SLP  $< 9$  meses presentaban globalmente una menor expresión de genes relacionados con la respuesta inmune, destacando únicamente mayor expresión del gen PPARG frente al otro grupo comparador. No obstante, al realizar el ajuste mediante FDR (10%) ninguno de los genes mantuvo la significación estadística. [**Tabla 14**]



**Tabla 14.** Genes diferencialmente expresados en el tumor de pacientes con CCRm tratados con diferentes tasas de SLP en el tratamiento con bevacizumab asociado a la quimioterapia.

ARNm	Log 2 fold change	Lineal fold change	valor p	valor p ajustado	Función relacionada
<b>PECAM1</b>	-0,825	0,565	2,79E-5	0,126	Función de transporte
<b>PPARG</b>	0,626	1,54	0,000155	0,25	
<b>TAL1</b>	-1	0,499	0,000165	0,25	Regulación
<b>FEZ1</b>	-0,829	0,563	0,000315	0,291	Función celular
<b>CCR1</b>	-0,96	0,514	0,000322	0,291	Citotóxicas, Citoquinas, NK, regulación, función T-cell
<b>JAM3</b>	-0,911	0,532	0,000427	0,322	
<b>MCAM</b>	-0,92	0,529	0,000568	0,367	Adhesión
<b>CDH5</b>	-0,647	0,638	0,000172	0,403	
<b>FCGR1A</b>	-2,16	0,224	8,00E-04	0,403	
<b>TNFRSF11B</b>	1,37	2,58	0,00108	0,49	Familia TNF

A continuación, y utilizando los niveles de expresión génica, se realizó un análisis comparativo de 14 poblaciones de células inmunitarias (células B, mastocitos, células CD8+ agotadas, células dendríticas, células NK, células Treg, células CD45+, células TH 1, neutrófilos, célula NK CD56dim y macrófagos). Tras el ajuste por FDR (10%) no se encontró significación estadística en ninguna de ellas entre pacientes que presentaban una SLP  $\geq 9$  meses y SLP  $<9$  meses a la terapia con bevacizumab asociada a quimioterapia [Figura 16]. Dentro del grupo de mayor SLP destacamos que las poblaciones celulares con mayor abundancia fueron los neutrófilos, los macrófagos

y los linfocitos Treg, mientras que las poblaciones celulares T y B mostraron un resultado opuesto.

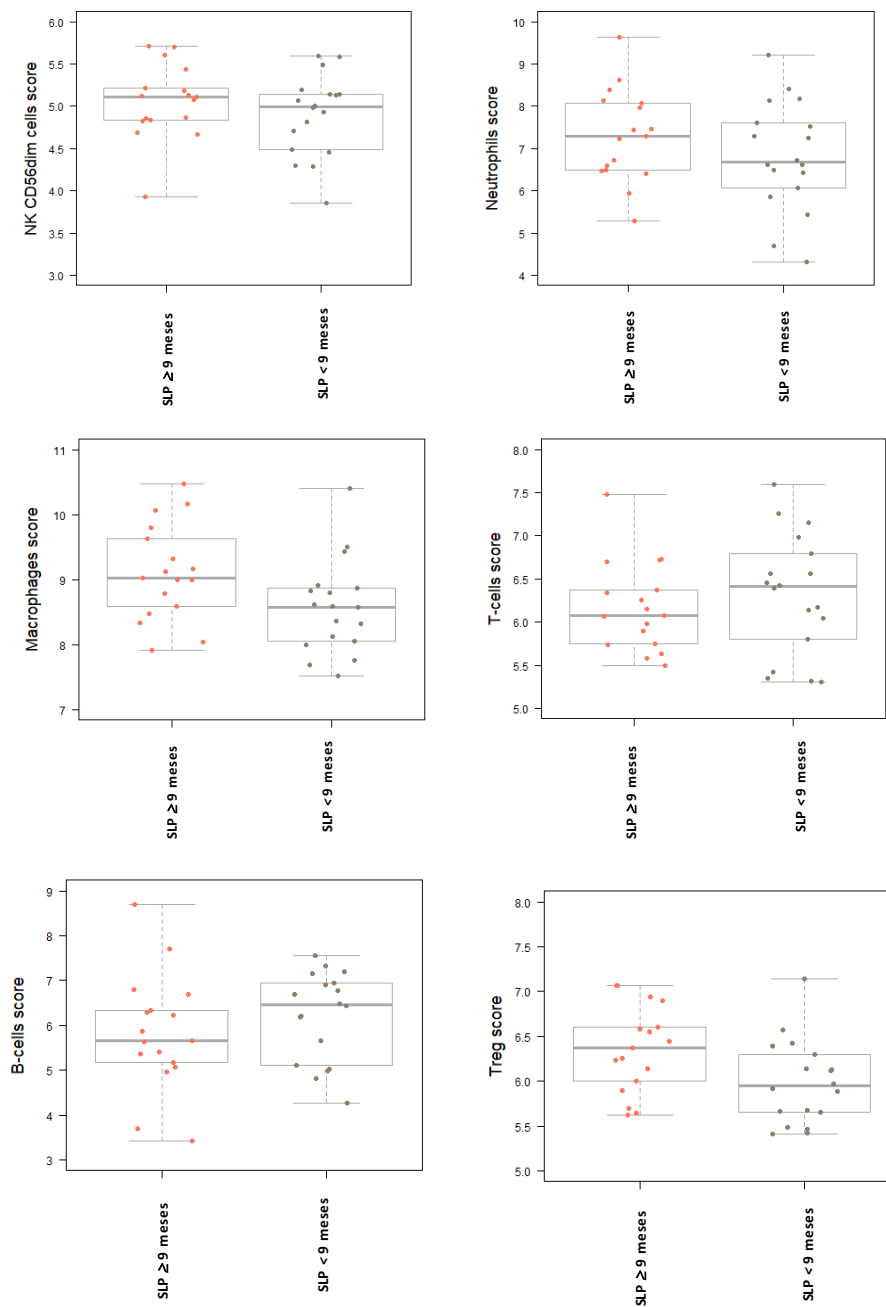


Figura 16. Análisis de las diferentes poblaciones celulares inmunitarias (NK C56dim, neutrófilos, macrófagos, células T, células B y linfocitos T reguladores) en los tumores de los pacientes con CCRm. Se representan las poblaciones celulares relativas comparando aquellos pacientes de CCRm con una SLP  $\geq$  9 meses y una SLP < 9 meses tras el tratamiento con bevacizumab asociado a quimioterapia.



## ***VII. DISCUSIÓN***



La angiogénesis es un proceso esencial en el crecimiento tumoral y la formación de las metástasis. Ya hace más de 50 años que Folkman y cols. (180) propusieron que su inhibición podría detener la progresión del tumor y desarrollaron el concepto de “terapia antiangiogénica”. Sin embargo, hoy en día sabemos que no todos los tumores ni todos los pacientes se benefician por igual de esta terapia, necesitando progresar en su conocimiento y dar respuesta a cuestiones aun no resueltas, como son la identificación de biomarcadores predictivos de respuesta, características pronósticas asociadas a mejor supervivencia y mecanismos de resistencia adquiridos durante la administración de la terapia.

En el tratamiento actual del CCRm disponemos de la aprobación de varios fármacos antiangiogénicos con diferentes mecanismos de acción. Concretamente, bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a VEGF-A, inhibiendo la unión de este con sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2. Su principal indicación es en combinación con la quimioterapia en primera línea para el CCRm, mejorando la tasa de respuesta y la supervivencia (67, 68), siendo ésta la población analizada en nuestro trabajo.

En la era de la medicina de precisión, una cuestión aún sin resolver, debido al complejo mecanismo molecular que subyace al proceso angiogénico, es la identificación de biomarcadores útiles y validados en la práctica clínica que nos aporten información predictiva y/o pronóstica de respuesta o supervivencia en pacientes que reciben la terapia antiangiogénica. Las investigaciones más recientes destacan el papel de otras vías moleculares implicadas en el desarrollo y el escape angiogénico, activadas por la hipoxia tumoral y dependientes directa o indirectamente de la vía de VEGF-A, lo que podría dar explicación a probables mecanismos de resistencia (181). Por lo tanto, la investigación va encaminada a la comprensión de vías alternativas o combinación de varias terapias como estrategia terapéutica (182), lo que dificulta aún más la identificación de un único biomarcador efectivo.

En el presente estudio se ha propuesto analizar la asociación entre la respuesta a bevacizumab y los niveles circulantes y en tejido tumoral de biomarcadores implicados en distintas fases del proceso angiogénico en CCRm, establecer una posible relación predictiva y pronóstica entre ellos y profundizar en su relación con el perfil de la respuesta inmune antitumoral.

Los primeros resultados relevantes derivados de nuestro trabajo se han encontrado al analizar los niveles plasmáticos basales de VEGF-A en nuestra población con CCRm, encontrando que aquellos pacientes que presentan niveles basales altos (>0,4408ng/mL) de VEGF-A tuvieron una menor SLP y SG de forma estadísticamente significativa, con independencia de otros factores pronósticos conocidos. VEGF-A es el biomarcador más estudiado para predecir la respuesta al tratamiento con antiangiogénicos (183), siendo el ligando principal con el que compete el bevacizumab e inhibiendo la unión de este con sus receptores. La expresión de VEGF-A se encuentra elevada en el microambiente tumoral (184) y a día de hoy, la relación de sus niveles de expresión con la eficacia de la terapia (185), localización metastásica (78) y la aparición de resistencias están en discusión (186-188).

Los resultados mostrados en este trabajo apoyan lo descrito previamente en la literatura, mostrando que los niveles de VEGF-A en CCRm podrían tener un valor pronóstico. Concretamente, en el análisis retrospectivo dentro del ensayo clínico HORIZON III (76), donde se aleatorizaron 1422 pacientes a recibir mFOLFOX-6 con cediranib o bevacizumab, se identificó que los niveles basales altos de VEGF-A se asociaron con una peor SLP (HR=1,20; IC 95%, 1,04–1,38) sin encontrar diferencias en SG. Así mismo, Hegde y cols. (77) analizaron los niveles de VEGF-A en cuatro ensayos fase III de bevacizumab con un total de 1816 pacientes, demostrando su impacto negativo en SG en diferentes tipos de tumores, incluido el CCR (HR = 1,76; IC 95 %, 1,28–2,41). Ha sido en 2021, cuando Élez y cols. evaluaron también el valor de VEGF-A dentro del ensayo clínico POLAF (81), en segunda línea de CCRm con otro antiangiogénico

(aflibercept) asociado a FOLFIRI, demostrando que los niveles basales de VEGF-A < 1941pg/mL tuvieron una mediana mayor de SLP y SG.

No obstante, también existen estudios que no encuentran esta relación de VEGF-A con la supervivencia. Kopetz y cols. (82), en un estudio fase II con 40 pacientes con CCRm, en tratamiento de primera línea con FOLFIRI asociado a bevacizumab, no encontraron asociación entre los niveles en plasma de VEGF-A y la SLP o la SG. Igualmente, Moreno-Muñoz y cols. no encontraron diferencias en respuesta ni supervivencia en una cohorte de pacientes de CCR (N=46) y cáncer de mama (N=49) con diferentes esquemas de quimioterapia añadida a bevacizumab (84). Probablemente la metodología empleada y el tamaño muestral limitado de estos estudios pueda explicar estas discrepancias.

En cuanto al valor predictivo de respuesta de VEGF-A existe más controversia. Nosotros encontramos en nuestra cohorte de pacientes que aquellos que presentan mayores niveles basales de VEGF-A (>0,4407ng/ml) al inicio del tratamiento tienen una menor SLP. Aunque no es un estudio comparable con el nuestro, puesto que utiliza una metodología de determinación de VEGF-A mediante ARNm, destacamos la publicación en 2017 de Marisi y cols. Se trata de un análisis retrospectivo con 129 pacientes con CCRm incluidos en el estudio fase III ITACA tratados con quimioterapia asociada o no a bevacizumab. Se analizaron los niveles de ARNm de VEGF-A circulante al inicio, en la primera evaluación de respuesta y a la progresión de la enfermedad. Los resultados demostraron que aquellos pacientes tratados con bevacizumab que presentaban en la evaluación de respuesta una reducción  $\geq 30\%$  en los niveles de VEGF-A mostraron una mayor SG frente a los que no la presentaron (HR 0,38, IC95% 0,19–0,78,  $p=0,008$ ), sin encontrar diferencias en aquéllos tratados sólo con quimioterapia, proponiendo a VEGF-A como marcador predictivo de respuesta a bevacizumab (80). En este trabajo, a diferencia del nuestro, no encuentran relación entre los niveles de VEGF-A basales con la SG ni describe el resultado sobre la SLP. Además, realiza la selección de pacientes

respondedores en la primera evaluación de respuesta y no al inicio de la terapia, lo que obliga a que todos los pacientes reciban bevacizumab, pudiendo resultar nuestras diferencias basales más relevantes.

Pero en la literatura no queda claro que una reducción en las determinaciones seriadas de los valores de VEGF-A a lo largo de la terapia, se corresponda con mejor respuesta y supervivencia. Por un lado, en consonancia con lo descrito con Marisi y cols, disponemos de análisis previos de farmacodinámica en ensayos clínicos realizados en fases tempranas y con escaso número de pacientes. Entre ellos, destacamos la publicación del grupo italiano liderado por Loupakis y cols. (189), que describieron una reducción en los niveles de VEGF-A sérico libre en cinco pacientes con CCRm tratados con un anticuerpo anti-VEGF en comparación con las concentraciones séricas basales, proponiéndolo como un marcador subrogado de la terapia antiangiogénica. Por el contrario, Willett y cols., en el contexto de un ensayo clínico fase II en cáncer de recto con 32 pacientes, administrando bevacizumab solo o en combinación con quimioterapia y/o radioterapia, comunicaron un aumento plasmático de VEGF-A tras recibir el tratamiento sin quimioterapia añadida (190).

La dificultad en la interpretación de estos estudios con resultados contradictorios podría justificarse por varias causas. Por un lado, la mayoría se trata de análisis retrospectivos en el contexto de ensayos clínicos no prediseñados para encontrar diferencias, algunos de ellos con tamaño muestral limitado. A esto se añade, que los valores de VEGF-A son dinámicos a lo largo del proceso tumoral, sin quedar claro el momento idóneo de su determinación para obtener una mayor utilidad clínica en los resultados. Tampoco disponemos de una metodología uniforme en las determinaciones analíticas, lo que dificulta la validación de un punto el corte estandarizado. Por último, un aspecto importante a destacar es la imposibilidad de poder administrar en CCRm bevacizumab como agente único, por tener un efecto antitumoral limitado (169).

Junto con el análisis de VEGF-A, se ha explorado la asociación entre la terapia antiangiogénica y el SRAA. Nuestros resultados muestran que pacientes con CCRm que presentan al inicio del tratamiento de quimioterapia asociada a bevacizumab niveles altos en plasma de ECA (>141,85ng/ml) muestran una mayor tasa de SG sin encontrar diferencias en SLP.

ECA es un enzima clave en el SRAA, desarrollando un importante papel en los efectos reguladores sobre la presión arterial (191). La función de ECA es convertir Ang-I en Ang-II, favoreciendo la expresión de factores proangiogénicos como, por ejemplo, el VEGF-A (192). ECA está implicado en la patogenia de varios tumores (193), su expresión es variable en cada tipo de tumor (104) y su inhibición suprime el crecimiento tumoral y la angiogénesis (192). Sin embargo, en la literatura su implicación en el pronóstico del CCR es incierta, motivo por el que nos resultó interesante incluirla en nuestro análisis.

A diferencia de nuestro trabajo, donde se realizan determinaciones plasmáticas de la ECA mediante la técnica ELISA, la mayoría de los estudios que analizan su relación con el riesgo y la supervivencia en CCR, se centran en la determinación del polimorfismo I/D y sus tres genotipos (D/D, I/I e I/D). En este sentido, como se ha comentado previamente en la introducción, existen varios metaanálisis publicados con discrepancias en sus resultados sobre la relación de la ECA y el riesgo de CCR (89, 104, 106). La mayoría concluyen que no existe correlación entre los polimorfismos genéticos de la ECA y el riesgo de CCR, a excepción del metaanálisis publicado por Yang y cols. en 2015 (105), donde se describe un incremento de riesgo del 16% para CCR en aquellos pacientes con el genotipo I/I.

La relación de la ECA con el pronóstico en CCRm está poco explorada. Por su relación con el presente trabajo, merece la pena destacar el artículo publicado por Moreno-Muñoz y cols. (84), donde se genotiparon los polimorfismos del gen *ACE* en 46 pacientes con CCRm, no encontrando diferencias significativas entre el polimorfismo I/D y la supervivencia. Además, en este estudio, al igual que en el nuestro, también se

analizó la relación entre los niveles plasmáticos de la ECA en 116 pacientes con cáncer de colon y mama que habían recibido tratamiento con bevacizumab. Los resultados mostraron que los pacientes con niveles de la ECA > 135ng/ml tenían un mejor tiempo de fallo a tratamiento (TFT) estadísticamente significativo ( $p < 0,036$ ), sin encontrar diferencias en SG. Continuando con esta línea de investigación, Élez y cols. publicaron en 2021 los datos del estudio comentado previamente, fase II POLAF, donde analizaron los niveles plasmáticos de la ECA con el mismo punto de corte de 135ng/ml, en 101 pacientes de CCRm previo inicio de tratamiento de quimioterapia en segunda línea con aflibercept asociado a FOLFIRI (81). En este trabajo, los resultados no demostraron diferencias entre los niveles de ECA y la SG. Somos conscientes de que los resultados de estos dos estudios no son comparables entre sí ni con el nuestro. Por una parte, nuestra población es exclusiva de pacientes con CCRm y por otra, la determinación de la ECA, se realiza previo inicio de bevacizumab con quimioterapia, en pacientes no tratados previamente. Estas diferencias podrían justificar los resultados encontrados en nuestra muestra de pacientes.

Otro dato discutible es el punto de corte de los niveles plasmáticos de la ECA en 135 ng/ml. Disponemos de estudios realizados en diferentes poblaciones, uno de ellos realizado dentro del ensayo clínico BR.24 realizado en 176 pacientes con cáncer de pulmón avanzado tratados con cediranib asociado o no a la quimioterapia (194) y el otro un subanálisis dentro del ensayo clínico LEA que incluyó 266 pacientes con cáncer de mama y comparaba añadir o no bevacizumab a la terapia hormonal (195). En ambos, se estableció el valor de la ECA en 115 ng/ml, siendo descrito en el primero de ellos como el punto de corte más sensible y específico. En nuestro trabajo, al no disponer de un punto de corte estandarizado, al igual que con VEGF-A y galectinas, hemos pretendido hacer una descripción del efecto biológico gradual en forma de terciles, estableciendo una división homogénea de los pacientes y permitiéndonos hacer visible el hallazgo biológico de que existen grupos de pacientes de alto y bajo riesgo, donde el



conocimiento del valor plasmático de la ECA podría tener su utilidad pronóstica, con impacto en SG que tienden a la significación ( $p=0,053$ ), resultando interesante poder validarlo en estudios con mayor tamaño muestral.

En este trabajo, también se realizó el análisis de los valores plasmáticos basales de galectinas-1, -3 y -9. En nuestra cohorte de pacientes con CCRm no se observaron relaciones significativas entre sus niveles previo inicio de tratamiento y la supervivencia de los pacientes. Hasta la actualidad, la actividad angioestimuladora de las galectinas se han relacionado con varias vías de señalización, incluido el eje de VEGF/VEGFR-2, de integrinas y de la vía Ras. La capacidad de galectina-1, -3 y -8 para desencadenar estas vías de señalización se ha relacionado con la activación de diferentes receptores como VEGFR-2, NP-1, beta-integrinas y CD166 (118), donde la galectina-9 probablemente también participe. Además, destacamos su implicación en el escape de la respuesta inmune de la célula tumoral, siendo consideradas como potenciales biomarcadores de mal pronóstico (196).

El papel de galectina-9, es el más desconocido. Datos recientes publicados por Moroshita y cols. (128), indican que tiene función supresora *in vivo e in vitro* en la proliferación de las líneas celulares de CCR. En la literatura no disponemos de estudios previos publicados que, como nuestro trabajo, aporten información sobre su valor pronóstico en CCR. Por otro lado, la más estudiada en estadios precoces y avanzados en CCR ha sido la galectina-3, destacando los resultados de dos metaanálisis recientes. El primero publicado por Wang C y cols. (124) que analizó los resultados de 36 estudios previos, donde en el análisis por subgrupos, se correlacionó la alta expresión de galectina-3 en CCR con menor SG y SLE. El segundo metaanálisis publicado en 2019 (125), incluyó 1661 pacientes de 15 estudios y encontró asociaciones estadísticamente significativas entre la alta expresión de galectina-3 y una peor SG en CCR, asociándola a características clinicopatológicas desfavorables. Así mismo, la expresión de galectina-3 ha sido analizada junto con galectina-1 en enfermedad localizada, donde esta última

se asoció con mayor presencia de afectación ganglionar en pacientes que presentaban antígeno CEA normal, destacando su posible papel pronóstico (126). Las principales diferencias de estos estudios con el nuestro, se centran en la metodología empleada en los estudios incluidos en los metaanálisis (inmunohistoquímica) y que nuestra población está constituida exclusivamente por pacientes metastásicos, lo que explicaría posiblemente la mayor dificultad para demostrar diferencias.

A pesar de no disponer de estudios comparables con el nuestro, en la población analizada tratada con bevacizumab asociada a la quimioterapia no hemos encontrado asociación significativa entre los niveles plasmáticos basales de las galectinas analizadas y la SLP o la SG. Estos hallazgos podrían estar justificados por no disponer nuestro trabajo de suficiente potencia estadística, siendo necesarios nuevos estudios con un mayor tamaño muestral.

Los resultados descritos en nuestro trabajo indican que VEGF-A y ECA pueden constituir posibles biomarcadores en pacientes con CCRm que reciben tratamiento con bevacizumab asociado a quimioterapia, por lo que hemos realizado un análisis de supervivencia combinando los niveles plasmáticos de ambos biomarcadores.

Este estudio nos ha permitido establecer una clasificación pronóstica en función de las determinaciones plasmáticas de VEGF-A y ECA agrupadas en terciles. Encontramos que los pacientes que presentan niveles bajos de VEGF-A y niveles altos de ECA (grupo de bajo riesgo) comparado con los pacientes que presentan niveles altos de VEGF-A y niveles bajos de ECA (grupo de alto riesgo) tuvieron un incremento significativo en SG (29,8 meses (IC95% 21,7-37,9) vs 16,6 meses (IC95% 13,2-20,0), p-value= 0,007). Por el contrario, no se identificaron diferencias en términos de SLP.

La asociación biológica entre estos dos biomarcadores obedece a su participación en el proceso angiogénico. La ECA permite la formación de Ang-II, esta actúa sobre el receptor AT-1 que activa las vías moleculares PI3K/AKT/mTOR y JAK/STAT, favoreciendo la producción de VEGF-A, TGFβ1, EGFR y fibronectina que en última

instancia conducen a una mayor proliferación celular, angiogénesis, fibrosis, invasión tumoral y metástasis (95).

Son numerosos los estudios que asocian marcadores genéticos o normogramas pronósticos con el riesgo de mortalidad en CCRm (197-199), pero realmente son escasos los que se encuentran validados e incorporados en la decisión terapéutica. Probablemente esté justificado por el coste en la determinación, las limitaciones en la cantidad de tumor de la muestra tisular, la necesidad de una validación externa y la heterogenicidad biológica del CCRm.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que realiza esta asociación y que identifica las determinaciones plasmáticas basales de VEGF-A y la ECA como posibles biomarcadores pronósticos de supervivencia en pacientes con CCRm que reciben tratamiento de primera línea de quimioterapia asociada a bevacizumab, permitiendo establecer grupos pronósticos de riesgo de mortalidad (alto, intermedio y bajo).

Así mismo, se completó con un análisis multivariante de SG mediante regresión de Cox donde se incluyeron otras variables pronósticas clínicas y moleculares ampliamente conocidas (la edad, el género, el ECOG al diagnóstico, la localización del tumor primario, el estado mutacional de RAS y el número de localizaciones metastásicas). Los resultados de este análisis confirman que los marcadores pronósticos de mayor riesgo de mortalidad son el grupo que presenta niveles plasmáticos altos de VEGF-A y bajos de la ECA (alto riesgo), ECOG 1 y localización derecha del tumor primario.

Estos hallazgos, no descritos previamente en la literatura científica, podrían suponer una herramienta con una buena relación coste-eficacia que nos ayude a identificar dos poblaciones de alto y bajo riesgo en CCRm. Por un lado, un grupo de mejor pronóstico que presentan una mayor SG tras la administración de bevacizumab asociada a la quimioterapia, generando nuevas hipótesis de trabajo que validen su papel predictivo de respuesta y aclarar el valor pronóstico en pacientes con indicación de resección quirúrgica en enfermedad metastásica de CCRm. Por otro lado, el conocimiento de un

grupo de alto riesgo de mortalidad, con menor SG, hace interesante la necesidad de investigar nuevas opciones terapéuticas o realizar un abordaje más intensivo en la actitud terapéutica en primera línea como podría ser el uso de tripletes asociado a una terapia dirigida o realizar un seguimiento más intensivo de las posibles recaídas tempranas o resistencias adquiridas a los tratamientos administrados.

Finalmente, los resultados derivados del análisis de los paneles de expresión génica inmune anti-tumoral realizados en 35 muestras del total de la población incluida en el estudio, mostraron un perfil génico inmune diferente entre aquellos pacientes con CCRm que presentan una SLP mayor o menor a 9 meses durante la terapia con bevacizumab asociado a quimioterapia. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de cada gen tras el ajuste por FDR (10%).

En pacientes con CCR y MSI-H se ha demostrado que altas densidades de células inmunes se han relacionado con un mejor pronóstico y supervivencia de los pacientes asociándolo con su respuesta a la inmunoterapia (200, 201). Además, sabemos que la angiogénesis desempeña un papel fundamental en la modulación del microambiente inmunitario del tumor, (162) desarrollándose en la actualidad prometedores ensayos clínicos que combinan ambas terapias. El poder identificar aquellos pacientes que tienen un perfil de respuesta inmune concreta, que se asocia a una mayor respuesta a la terapia con bevacizumab, supondría un gran avance en el conocimiento de posibles biomarcadores predictivos de respuesta.

En la literatura disponemos de escasos estudios que evalúen este perfil inmune en pacientes con CCR. Concretamente, este año ha sido publicado un estudio utilizando nuestra metodología PanCancer nCounter<sup>®</sup>, en el que se analizaron las diferencias entre pacientes portadores de una mutación genética asociada al síndrome de Lynch que presentaban CCR (N=10), portadores sanos (N=10) y pacientes con CCR (N=10). Los autores concluyen que el medio inmunitario de la mucosa colorrectal normal puede jugar un papel modificador del riesgo tumoral en el síndrome de Lynch, mostrando los

portadores una infiltración elevada de células T en la mucosa incluso en ausencia de tumor (202).

Este es el primer estudio que analiza las diferencias en el perfil inmune en las muestras de pacientes con CCRm que van a recibir terapia antiangiogénica previa a su administración. Dentro de los genes más sobreexpresados en los pacientes con SLP  $\geq$  9 meses, destacamos el gen PECAM-1. La molécula de adhesión celular endotelial-1 (PECAM-1), también llamada CD31, está expresada en la superficie de los granulocitos, los monocitos y las plaquetas humanas, ejerciendo un papel fundamental en regular la barrera de permeabilidad vascular de las células endoteliales y el proceso de angiogénesis (203).

En consonancia con nuestros resultados, en 2020, Bianconi y cols. (176), publicaron un análisis de 74 pacientes con CCRm tratados con bevacizumab y quimioterapia, realizando, entre otras, la determinación de la densidad microvascular de CD31 en las muestras mediante inmunohistoquímica. Los resultados demostraron que la baja densidad de microvasos está asociada con una menor SLP (HR ajustada por duplicación de la expresión de CD31 (95%IC: 0,30-0,95,  $p=0,034$ )), coincidiendo con lo descrito en estudios retrospectivos previos (204). Por lo tanto, a pesar de no alcanzar la significación estadística, nuestros resultados sugieren seguir investigando la sobreexpresión de PECAM-1 en CCRm como posible biomarcador predictivo de respuesta a la terapia con bevacizumab asociada a la quimioterapia.

Por otro lado, en el análisis de subpoblaciones celulares relacionado con el sistema inmune, los pacientes con mayor SLP al tratamiento con bevacizumab presentan mayor número de neutrófilos, linfocitos Treg y mastocitos. Estas poblaciones inmunes ejercen un efecto inmunosupresor, pudiendo actuar el tratamiento con bevacizumab en pacientes que presentan una mayor SLP como modulador del microambiente inmunitario tumoral, y como consecuencia, aumentar la duración de la respuesta (162).

En conclusión, ante los hallazgos derivados de nuestro trabajo, proponemos VEGF-A como posible biomarcador pronóstico y predictivo de respuesta a bevacizumab asociado a la quimioterapia en CCRm, ECA como probable biomarcador pronóstico y establecemos una posible clasificación pronóstica de riesgo de mortalidad en pacientes con CCRm, según los niveles plasmáticos basales de VEGF-A y ECA previo inicio de la terapia antiangiogénica. Este conocimiento, presenta a nuestro juicio, una gran relevancia desde el punto de vista clínico, ya que podría suponer una determinación factible y útil en la práctica asistencial con beneficio coste-eficaz del tratamiento antiangiogénico, mejores resultados terapéuticos y evitando toxicidades innecesarias.

Por último, reconocemos las limitaciones del presente estudio que deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados. La primera es que se trata de un estudio observacional, con tamaño muestral limitado, sin grupo control que nos permita aclarar el papel de dichos biomarcadores en los pacientes que reciben tan solo quimioterapia. También destacamos que al no disponer de un punto de corte estandarizado para VEGF-A y la ECA, hemos realizado un análisis en función de terciles con el objetivo de diferenciar los grupos de forma gradual que presentan mayor o menor beneficio. Además, resultaría interesante ver la evolución de dichos biomarcadores en los puntos críticos del proceso de la enfermedad tumoral en CCRm. Respecto a los resultados obtenidos derivados de los paneles de expresión génica inmune, debe considerarse como un análisis preliminar, donde la limitación en el tamaño muestral nos permite generar nuevas hipótesis sin poder demostrar resultados concluyentes.

Por tanto, nuestros resultados nos animan a la realización de nuevos estudios prospectivos randomizados en una cohorte de validación externa con mayor tamaño muestral que permitan corroborar el verdadero valor predictivo y pronóstico de los biomarcadores VEGF-A y ECA y de los perfiles de respuesta inmune en pacientes que reciben tratamiento de bevacizumab asociado a la quimioterapia en CCRm.

En definitiva, una vez analizados y discutidos los principales resultados que aportamos derivados de nuestro trabajo en pacientes con CCRm que van a recibir tratamiento de bevacizumab asociado a la quimioterapia son:

- 1) Los niveles plasmáticos basales altos de VEGF-A se asociaron de forma significativa a una menor SLP y SG.
- 2) Los niveles plasmáticos basales altos de la ECA se asociaron a una mejoría en SG, sin diferencias en SLP.
- 3) La determinación basal conjunta de ambos niveles plasmáticos de VEGF-A y la ECA ha permitido establecer tres grupos pronósticos de bajo, intermedio y alto riesgo de mortalidad. Dentro de estos tres grupos, los pacientes con niveles basales plasmáticos altos de VEGF-A y bajos de la ECA se asociaron a una disminución significativa en SG, sin diferencias en SLP.
- 4) No se objetivaron diferencias significativas entre la SG y la SLP y los niveles basales plasmáticos de galectinas-1, -3 y -9.
- 5) En el análisis de paneles de perfil inmune anti-tumoral en 35 muestras de tumor primario de CCRm, encontramos genes expresados diferencialmente entre los grupos con SLP mayor o menor de 9 meses previo a recibir tratamiento con bevacizumab asociado a la quimioterapia, sin alcanzar la significación estadística tras el análisis ajustado.





## ***VIII. CONCLUSIONES***



1.- En pacientes con CCRm que van a recibir tratamiento de primera línea con bevacizumab asociado a la quimioterapia, la determinación de los niveles plasmáticos basales de VEGF-A y ECA permitiría identificar aquellos que presentan una mejor respuesta al tratamiento antiangiogénico y una supervivencia más prolongada. Estos análisis permiten establecer una clasificación pronóstica de riesgo de mortalidad en función de los terciles poblacionales de dichos biomarcadores realizados previamente al inicio de la terapia.

2.- Los hallazgos del presente trabajo refuerzan además la idea de una estrecha asociación entre el Sistema Renina Angiotensina Aldosterona y la respuesta antiangiogénica en cáncer, apoyando la realización de futuros estudios que confirmen estos resultados y poder implementar el uso de estos biomarcadores en la práctica clínica.



## ***IX. ABREVIATURAS***



5-FU: 5-Fluorouracilo

## **A**

AJCC: American Joint Committee on Cancer

Ang: angiotensina

Ang-I: angiotensina I

Ang-II: angiotensina II

AT-1: receptor de angiotensina II tipo 1

AT-2: receptor de angiotensina II tipo 2

## **B**

BR: receptor de la bradiquinina

## **C**

CCR: cáncer colorrectal

CCRM: cáncer colorrectal metastásico

CD: células dendríticas

CEA: antígeno carcinoembrionario

CIN: inestabilidad cromosómica

CTLA-4: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos

## **D**

DRC: dominio de reconocimiento de carbohidratos

DPyD: enzima dihidropirimidina deshidrogenasa

## **E**

ECA: enzima convertidora de angiotensina

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EE: enfermedad estable

EGF: *Epidermal Growth Factor* (factor de crecimiento epidérmico)

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor* (receptor del factor epidérmico de crecimiento)

ETM: transición epitelio meséquima

## **F**

FGF *Fibroblast Growth Factor* (factor de crecimiento de fibroblastos)

FGFR: *Fibroblast Growth Factor Receptor* (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos)

b-FGF: *basic Fibroblast Growth Factor* (factor de crecimiento de fibroblastos básico)

## **H**

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

HIF-1 $\alpha$ : factor inducible de hipoxia.

HTA: hipertensión arterial

## **I**

IL: interleuquina

IGF-2: *factor de crecimiento insulínico 2*

## **L**

LDH: lactato deshidrogenasa

LV: leucovorina

## **M**

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MDSC: células supresoras derivadas de la línea mieloides.

MSI: inestabilidad de microsatélites

MSI-L: baja inestabilidad de microsatélites

MSI-H: alta inestabilidad de microsatélites

MSS: micosatelites estables

## **N**

NCI: Instituto Nacional del Cancer

NLR: ratio neutrófilo-linfocito



NK: *natural killer*

NO: óxido nítrico

NRP: receptor de la neuropilina

NTRK: proteína de tirosina quinasa transformadora.

NV: no valorable

## **P**

PAF poliposis adenomatosa familiar

PD-1: receptor de muerte celular programada

PDGFR: *Platelet Derived Growth Factor Receptors* (factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PE: progresión de enfermedad

PET: tomografía por emisión de positrones

PGE2: prostaglandina E2

PIGF: *Placental Growth Factor* (factor de crecimiento plaquetario)

## **Q**

QT: quimioterapia

## **R**

RAS WT: RAS wild type

RC: respuesta completa

RM: resonancia magnética

RP: respuesta parcial

## **S**

SG: supervivencia global

SLE: supervivencia libre de enfermedad

SLP: supervivencia libre de progresión

SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona

## **T**

T1: tercil 1

T2: tercil 2

T3: tercil 3

TAC: tomografía axial computarizada

TFT: tiempo al fallo de tratamiento

TGF $\beta$ : *factor de crecimiento transformante  $\beta$*

TIM-3: dominio de mucina 3

TNF- $\alpha$ : *Tumor Necrosis Factor* (factor de necrosis tumoral).

TR: tasa de respuestas

TRO: tasa de respuestas objetivas

TTD: Grupo de Tratamiento de los Tumores Digestivos

TTP: tiempo hasta la progresión

## **U**

UGTR1A1: uridina difosfato glucoronosiltransferasa 1A1.

## **V**

VEGF-A: *Vascular Endothelial Growth Factor* (factor de crecimiento endotelial vascular)

VEGFR: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular)

## ***X. ANEXO I***



**Tabla 1.** Sistema de estadificación convencional TNM del AJCC. A) Definiciones para T, N, M.  
B) Grupos pronósticos.

Tabla 1. A	
	<b>TUMOR PRIMARIO (T)</b>
<b>Tx</b>	El tumor primario no se puede evaluar
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial o invasión de lámina propia
<b>T1</b>	Invade submucosa
<b>T2</b>	Invade muscular propia
<b>T3</b>	Invade los tejidos pericólicas a través de la muscular propia
<b>T4a</b>	Penetra la superficie del peritoneo visceral
<b>T4b</b>	Invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras
	<b>GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)</b>
<b>NX</b>	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar
<b>N0</b>	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
<b>N1</b>	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
<b>N1a</b>	Metástasis en uno de los ganglios linfáticos regionales
<b>N1b</b>	Metástasis en 2-3 de los ganglios linfáticos regionales
<b>N1c</b>	Depósito de tumor en subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirrectales sin
<b>N2</b>	metástasis en los ganglios linfáticos
<b>N2a</b>	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
<b>N2b</b>	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales
	<b>METASTASIS A DISTANCIA (M)</b>
<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia
<b>M1a</b>	Metástasis confinada a un órgano o lugar (hígado, pulmón, ovario, etc)
<b>M1b</b>	Metástasis en más de un órgano o en el peritoneo

Tabla 1. B		
ESTADIO	TNM	DUKES MODIFICADA
<b>Estadio 0</b>	Tis N0 M0	A "in situ"
<b>Estadio I</b>	T1-2 N0	A Tumor limitado a mucosa  B1 No atraviesa pared, ganglios negativos
<b>Estadio IIA</b> <b>Estadio IIB</b> <b>Estadio IIC</b>	T3 N0 M0 T4a N0 M0 T4b N0 M0	B2 No se extiende macroscópicamente más allá de la pared intestinal, ganglios negativos  B3 Se extiende macroscópicamente más allá de la pared intestinal, ganglios negativos
<b>Estadio IIIA</b>  <b>Estadio IIIB</b>  <b>Estadio IIIC</b>	T1-2 N1/N1c T1 N2a T3-4 N1/N1c T2-3 N2a T1-2 N2b T1-4 N2b T3-4a N2b T4b N1-2	C1 No atraviesa pared, ganglios positivos  C2 Estadio B2 + ganglios positivos  C3 Estadio B3 + ganglios positivos
<b>Estadio IVA</b> <b>Estadio IVB</b>	Tx Nx M1a Tx Nx M1b	D Enfermedad metastásica a distancia

**Tabla 2.** Criterios RECIST. A) Parámetros de evaluación. B) Criterios de respuesta.**A)**

<b>Enfermedad medible</b>		
	Cómo medir	Medida unidimensional: diámetro máximo
	Tamaño mínimo	≥ 10 mm con TC helicoidal o RM (no menor que el doble del espesor de corte) ≥ 20 mm en radiografía de tórax bien definida y rodeada de aire
	Número total de lesiones	Máximo 5 lesiones y hasta 2 por órgano
	Ganglios linfáticos	Ganglios con eje corto ≥ 15 mm pueden ser lesión diana.
<b>Enfermedad no medible</b>		
		Lesiones inferiores a 10 mm Adenopatías con eje corto ≥ 10 y ≤ 15 mm Lesiones blásticas Quistes simples, indeterminados o Complejos Lesiones previamente tratadas o irradiadas salvo que progresen

**B)**

Respuesta completa (RC)	Desaparición de todas las lesiones y ausencia de ganglios patológicos
Respuesta parcial (RP)	Disminución $\geq 30\%$ de la suma de los diámetros máximos
Enfermedad estable (EE)	No cumple criterios de respuesta parcial ni de progresión
Progresión	Aumento $\geq 20\%$ de la suma de los diámetros y aumento absoluto $\geq 5$ mm en la suma de diámetros



## ***XI. BIBLIOGRAFÍA***



1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Guevara M, Molinuevo A, Salmeron D, Marcos-Gragera R, Carulla M, Chirlaque MD, et al. Cancer Survival in Adults in Spain: A Population-Based Study of the Spanish Network of Cancer Registries (REDECAN). *Cancers (Basel).* 2022;14(10).
3. Boland PM, Yurgelun MB, Boland CR. Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(3):217-31.
4. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control.* 2013;24(6):1207-22.
5. Ulanja MB, Rishi M, Beutler BD, Sharma M, Patterson DR, Gullapalli N, et al. Colon Cancer Sidedness, Presentation, and Survival at Different Stages. *J Oncol.* 2019;2019:4315032.
6. Liu PH, Wu K, Ng K, Zauber AG, Nguyen LH, Song M, et al. Association of Obesity With Risk of Early-Onset Colorectal Cancer Among Women. *JAMA Oncol.* 2019;5(1):37-44.
7. Daly MC, Paquette IM. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) and SEER-Medicare Databases: Use in Clinical Research for Improving Colorectal Cancer Outcomes. *Clin Colon Rectal Surg.* 2019;32(1):61-8.
8. Weiser MR. *AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer.* *Ann Surg Oncol.* 2018;25(6):1454-5.

9. Gomez-Espana MA, Gallego J, Gonzalez-Flores E, Maurel J, Paez D, Sastre J, et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer (2018). *Clin Transl Oncol*. 2019;21(1):46-54.
10. Kijima S, Sasaki T, Nagata K, Utano K, Lefor AT, Sugimoto H. Preoperative evaluation of colorectal cancer using CT colonography, MRI, and PET/CT. *World J Gastroenterol*. 2014;20(45):16964-75.
11. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
12. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2014;147(2):502-26.
13. Sinicrope FA. Lynch Syndrome-Associated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(8):764-73.
14. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
15. Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1).

16. Advani SM, Advani PS, Brown DW, DeSantis SM, Korphaisarn K, VonVille HM, et al. Global differences in the prevalence of the CpG island methylator phenotype of colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2019;19(1):964.
17. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.
18. Ten Hoorn S, de Back TR, Sommeijer DW, Vermeulen L. Clinical Value of Consensus Molecular Subtypes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2022;114(4):503-16.
19. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007;50(1):113-30.
20. Yoshino T, Argiles G, Oki E, Martinelli E, Taniguchi H, Arnold D, et al. Pan-Asian adapted ESMO Clinical Practice Guidelines for the diagnosis treatment and follow-up of patients with localised colon cancer. *Ann Oncol*. 2021;32(12):1496-510.
21. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.
22. Chibaudel B, Bonnetain F, Tournigand C, Bengrine-Lefevre L, Teixeira L, Artru P, et al. Simplified prognostic model in patients with oxaliplatin-based or irinotecan-based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a GERCOR study. *Oncologist*. 2011;16(9):1228-38.

23. Mizuno R, Kawada K, Itatani Y, Ogawa R, Kiyasu Y, Sakai Y. The Role of Tumor-Associated Neutrophils in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3).
24. Mehta A, Goswami M, Sinha R, Dogra A. Histopathological Significance and Prognostic Impact of Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(9):2447-53.
25. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2017;3(2):211-9.
26. Oh HH, Joo YE. Novel biomarkers for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Intest Res.* 2020;18(2):168-83.
27. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med.* 2012;10:85.
28. Li Y, Li W. BRAF mutation is associated with poor clinicopathological outcomes in colorectal cancer: A meta-analysis. *Saudi J Gastroenterol.* 2017;23(3):144-9.
29. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res.* 2012;18(23):6531-41.
30. Toh JWT, Phan K, Reza F, Chapuis P, Spring KJ. Rate of dissemination and prognosis in early and advanced stage colorectal cancer based on microsatellite instability status: systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis.* 2021;36(8):1573-96.

31. Nowak JA, Hornick JL. Molecular Evaluation of Colorectal Adenocarcinoma: Current Practice and Emerging Concepts. *Surg Pathol Clin.* 2016;9(3):427-39.
32. Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics.* 2016;8:25.
33. Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer.* 2003;2:41.
34. Chen TH, Chang SW, Huang CC, Wang KL, Yeh KT, Liu CN, et al. The prognostic significance of APC gene mutation and miR-21 expression in advanced-stage colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2013;15(11):1367-74.
35. Lech G, Slotwinski R, Slodkowski M, Krasnodebski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol.* 2016;22(5):1745-55.
36. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7518-28.
37. Nikolic A, Kojic S, Knezevic S, Krivokapic Z, Ristanovic M, Radojkovic D. Structural and functional analysis of SMAD4 gene promoter in malignant pancreatic and colorectal tissues: detection of two novel polymorphic nucleotide repeats. *Cancer Epidemiol.* 2011;35(3):265-71.

38. Voorneveld PW, Jacobs RJ, Kodach LL, Hardwick JC. A Meta-Analysis of SMAD4 Immunohistochemistry as a Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Transl Oncol.* 2015;8(1):18-24.
39. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(33):5313-27.
40. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg.* 1999;230(3):309-18; discussion 18-21.
41. Mei Z, Shi L, Wang B, Yang J, Xiao Z, Du P, et al. Prognostic role of pretreatment blood neutrophil-to-lymphocyte ratio in advanced cancer survivors: A systematic review and meta-analysis of 66 cohort studies. *Cancer Treat Rev.* 2017;58:1-13.
42. Tsai PL, Su WJ, Leung WH, Lai CT, Liu CK. Neutrophil-lymphocyte ratio and CEA level as prognostic and predictive factors in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):582-9.
43. Tang H, Li B, Zhang A, Lu W, Xiang C, Dong J. Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Colorectal Liver Metastasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159447.
44. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Battaglia L, Sozzi G, et al. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:185-90.



45. Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137:190-6.
46. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(3):262-71.
47. Lo Nigro C, Ricci V, Vivenza D, Granetto C, Fabozzi T, Miraglio E, et al. Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. *World J Gastroenterol.* 2016;22(30):6944-54.
48. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zobel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol.* 2011;22(7):1535-46.
49. Diaz LA, Jr., Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2022;23(5):659-70.
50. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(17):1632-43.

51. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 2009;69(5):1851-7.
52. Wang G, He Y, Sun Y, Wang W, Qian X, Yu X, et al. Prevalence, prognosis and predictive status of HER2 amplification in anti-EGFR-resistant metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol.* 2020;22(6):813-22.
53. Chau I. Trastuzumab deruxtecan: heralding biomarker-directed therapy in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2021;22(6):739-41.
54. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):271-82.
55. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(7):489-99.
56. Barbarino JM, Haidar CE, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for UGT1A1. *Pharmacogenet Genomics.* 2014;24(3):177-83.
57. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, et al. Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017;317(23):2392-401.

58. Krell RW, Reames BN, Hendren S, Frankel TL, Pawlik TM, Chung M, et al. Surgical Referral for Colorectal Liver Metastases: A Population-Based Survey. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(7):2179-94.
59. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, Pentheroudakis G, Yamazaki K, Xu RH, et al. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Ann Oncol.* 2018;29(1):44-70.
60. Robinson ES, Khankin EV, Karumanchi SA, Humphreys BD. Hypertension induced by vascular endothelial growth factor signaling pathway inhibition: mechanisms and potential use as a biomarker. *Semin Nephrol.* 2010;30(6):591-601.
61. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis.* 2014;17(3):471-94.
62. Geindreau M, Ghiringhelli F, Bruchard M. Vascular Endothelial Growth Factor, a Key Modulator of the Anti-Tumor Immune Response. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9).
63. Cao Y. Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Sci Signal.* 2009;2(59):re1.
64. Fantin A, Herzog B, Mahmoud M, Yamaji M, Plein A, Denti L, et al. Neuropilin 1 (NRP1) hypomorphism combined with defective VEGF-A binding reveals novel roles for NRP1 in developmental and pathological angiogenesis. *Development.* 2014;141(3):556-62.
65. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.

66. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1097-105.
67. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2335-42.
68. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008;26(12):2013-9.
69. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol*. 2005;23(16):3697-705.
70. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1539-44.
71. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Osterlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):29-37.

72. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol.* 2015;16(13):1306-15.
73. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3499-506.
74. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013;381(9863):303-12.
75. Canavese M, Ngo DT, Maddern GJ, Hardingham JE, Price TJ, Hauben E. Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2017;140(10):2183-91.
76. Jurgensmeier JM, Schmoll HJ, Robertson JD, Brooks L, Taboada M, Morgan SR, et al. Prognostic and predictive value of VEGF, sVEGFR-2 and CEA in mCRC studies comparing cediranib, bevacizumab and chemotherapy. *Br J Cancer.* 2013;108(6):1316-23.

77. Hegde PS, Jubb AM, Chen D, Li NF, Meng YG, Bernaards C, et al. Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):929-37.
78. Divella R, Daniele A, R DEL, Simone M, Naglieri E, Savino E, et al. Circulating Levels of VEGF and CXCL1 Are Predictive of Metastatic Organotropism in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(9):4867-71.
79. Van Cutsem E, Paccard C, Chiron M, Tabernero J. Impact of Prior Bevacizumab Treatment on VEGF-A and PlGF Levels and Outcome Following Second-Line Aflibercept Treatment: Biomarker Post Hoc Analysis of the VELOUR Trial. *Clin Cancer Res.* 2020;26(3):717-25.
80. Marisi G, Scarpi E, Passardi A, Nanni O, Ragazzini A, Valgiusti M, et al. Circulating VEGF and eNOS variations as predictors of outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving bevacizumab. *Sci Rep.* 2017;7(1):1293.
81. Elez E, Gomez-Espana MA, Gravalos C, Garcia-Alfonso P, Ortiz-Morales MJ, Losa F, et al. Effect of aflibercept plus FOLFIRI and potential efficacy biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer: the POLAF trial. *Br J Cancer.* 2022;126(6):874-80.
82. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):453-9.

83. Karpuz T, Araz M, Korkmaz L, Kilinc I, Findik S, Karaagac M, et al. The Prognostic Value of Serum Semaphorin3A and VEGF Levels in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2020;51(2):491-7.
84. Moreno-Munoz D, de la Haba-Rodriguez JR, Conde F, Lopez-Sanchez LM, Valverde A, Hernandez V, et al. Genetic variants in the renin-angiotensin system predict response to bevacizumab in cancer patients. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(12):1325-32.
85. Suenaga M, Cao S, Zhang W, Yang D, Ning Y, Okazaki S, et al. Genetic variants in CCL5 and CCR5 genes and serum VEGF-A levels predict efficacy of bevacizumab in metastatic colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2019;144(10):2567-77.
86. van Thiel BS, van der Pluijm I, te Riet L, Essers J, Danser AH. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol*. 2015;763(Pt A):3-14.
87. Xu J, Sun Y, Carretero OA, Zhu L, Harding P, Shesely EG, et al. Effects of cardiac overexpression of the angiotensin II type 2 receptor on remodeling and dysfunction in mice post-myocardial infarction. *Hypertension*. 2014;63(6):1251-9.
88. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 2008;93(5):519-27.
89. Ruiter R, Visser LE, Van Duijn CM, Stricker BH. The ACE insertion/deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11(4):421-30.

90. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotso M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1201-28.
91. Bernstein KE, Ong FS, Blackwell WL, Shah KH, Giani JF, Gonzalez-Villalobos RA, et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol Rev*. 2013;65(1):1-46.
92. Laghnam D, Jozwiak M, Nguyen LS. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Immunomodulation: A State-of-the-Art Review. *Cells*. 2021;10(7).
93. Haznedaroglu IC, Beyazit Y. Local bone marrow renin-angiotensin system in primitive, definitive and neoplastic haematopoiesis. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(5):307-23.
94. Luan Z, Liu B, Shi L. Angiotensin II-induced micro RNA-21 culprit for non-small-cell lung adenocarcinoma. *Drug Dev Res*. 2019;80(8):1031-9.
95. Afsar B, Afsar RE, Ertuglu LA, Kuwabara M, Ortiz A, Covic A, et al. Renin-angiotensin system and cancer: epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics. *Clin Transl Oncol*. 2021;23(4):682-96.
96. Okwan-Duodu D, Landry J, Shen XZ, Diaz R. Angiotensin-converting enzyme and the tumor microenvironment: mechanisms beyond angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(3):R205-15.
97. Bernardi S, Zennaro C, Palmisano S, Velkoska E, Sabato N, Toffoli B, et al. Characterization and significance of ACE2 and Mas receptor in human colon adenocarcinoma. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012;13(1):202-9.



98. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(7):293-9.
99. Coleman CI, Baker WL, Kluger J, White CM. Antihypertensive medication and their impact on cancer incidence: a mixed treatment comparison meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens.* 2008;26(4):622-9.
100. Shen J, Huang YM, Wang M, Hong XZ, Song XN, Zou X, et al. Renin-angiotensin system blockade for the risk of cancer and death. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2016;17(3).
101. Zhou Q, Chen DS, Xin L, Zhou LQ, Zhang HT, Liu L, et al. The renin-angiotensin system blockers and survival in digestive system malignancies: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(7):e19075.
102. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990;86(4):1343-6.
103. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res.* 1992;20(6):1433.
104. van der Knaap R, Siemes C, Coebergh JW, van Duijn CM, Hofman A, Stricker BH. Renin-angiotensin system inhibitors, angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, and cancer: the Rotterdam Study. *Cancer.* 2008;112(4):748-57.

105. Yang H, Cai C, Ye L, Rao Y, Wang Q, Hu D, et al. The relationship between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and digestive cancer risk: Insights from a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(4):1306-13.
106. Zhou X, Lin C. Survivin and angiotensin-converting enzyme polymorphisms with risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 2015;13:27.
107. Cheng Z, Liu Z. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2019;20(4):1470320319881932.
108. Wang L, Zhao Y, Wang Y, Wu X. The Role of Galectins in Cervical Cancer Biology and Progression. *Biomed Res Int.* 2018;2018:2175927.
109. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(1):29-41.
110. Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1855(2):235-47.
111. Nakahara S, Raz A. Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008;8(1):22-36.
112. Dings RPM, Miller MC, Griffin RJ, Mayo KH. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).

113. Ito K, Scott SA, Cutler S, Dong LF, Neuzil J, Blanchard H, et al. Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*. 2011;14(3):293-307.
114. Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med*. 2010;207(9):1981-93.
115. Markowska AI, Jefferies KC, Panjwani N. Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2011;286(34):29913-21.
116. D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, et al. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One*. 2013;8(6):e67029.
117. Aanhane E, Schulkens IA, Heusschen R, Castricum K, Leffler H, Griffioen AW, et al. Different angioregulatory activity of monovalent galectin-9 isoforms. *Angiogenesis*. 2018;21(3):545-55.
118. Thijssen VL, Rabinovich GA, Griffioen AW. Vascular galectins: regulators of tumor progression and targets for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(6):547-58.
119. Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Trans*. 1997;25(4):1194-8.

120. Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, et al. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology*. 1997;113(6):1906-15.
121. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2018;41(2):599-614.
122. Zaia Povegliano L, Oshima CT, de Oliveira Lima F, Andrade Scherholz PL, Manoukian Forones N. Immunoexpression of galectin-3 in colorectal cancer and its relationship with survival. *J Gastrointest Cancer*. 2011;42(4):217-21.
123. Tao L, Jin L, Dechun L, Hongqiang Y, Changhua K, Guijun L. Galectin-3 Expression in Colorectal Cancer and its Correlation with Clinical Pathological Characteristics and Prognosis. *Open Med (Wars)*. 2017;12:226-30.
124. Wang Y, Liu S, Tian Y, Wang Y, Zhang Q, Zhou X, et al. Prognostic role of galectin-3 expression in patients with solid tumors: a meta-analysis of 36 eligible studies. *Cancer Cell Int*. 2018;18:172.
125. Wang C, Zhou X, Ma L, Zhuang Y, Wei Y, Zhang L, et al. Galectin-3 may serve as a marker for poor prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis. *Pathol Res Pract*. 2019;215(10):152612.
126. Gopalan V, Saremi N, Sullivan E, Kabir S, Lu CT, Salajegheh A, et al. The expression profiles of the galectin gene family in colorectal adenocarcinomas. *Hum Pathol*. 2016;53:105-13.

127. Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, Nishi N, Yokomise H, Hirashima M. Galectin-9, a novel prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Breast J.* 2006;12(5 Suppl 2):S196-200.
128. Morishita A, Nomura K, Tani J, Fujita K, Iwama H, Takuma K, et al. Galectin9 suppresses the tumor growth of colon cancer in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2021;45(6).
129. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res.* 2015;128:95-139.
130. Wheeler KC, Jena MK, Pradhan BS, Nayak N, Das S, Hsu CD, et al. VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191040.
131. Bruno A, Focaccetti C, Pagani A, Imperatori AS, Spagnoletti M, Rotolo N, et al. The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Neoplasia.* 2013;15(2):133-42.
132. Detoraki A, Staiano RI, Granata F, Giannattasio G, Prevete N, de Paulis A, et al. Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1142-9, 9 e1-5.
133. Petty AJ, Yang Y. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy.* 2017;9(3):289-302.

134. Bruno A, Mortara L, Baci D, Noonan DM, Albini A. Myeloid Derived Suppressor Cells Interactions With Natural Killer Cells and Pro-angiogenic Activities: Roles in Tumor Progression. *Front Immunol.* 2019;10:771.
135. Long J, Hu Z, Xue H, Wang Y, Chen J, Tang F, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) impairs the motility and immune function of human mature dendritic cells through the VEGF receptor 2-RhoA-cofilin1 pathway. *Cancer Sci.* 2019;110(8):2357-67.
136. Lee JY, Park S, Min WS, Kim HJ. Restoration of natural killer cell cytotoxicity by VEGFR-3 inhibition in myelogenous leukemia. *Cancer Lett.* 2014;354(2):281-9.
137. Horikawa N, Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Baba T, Yamaguchi K, et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer Inhibits Tumor Immunity through the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Clin Cancer Res.* 2017;23(2):587-99.
138. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15(4):1069-74.
139. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2010;362(10):875-85.
140. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, Lo A, Husain Z, Thadhani RI, et al. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol.* 2013;190(8):3939-48.

141. Gotthardt D, Putz EM, Grundschober E, Prchal-Murphy M, Straka E, Kudweis P, et al. STAT5 Is a Key Regulator in NK Cells and Acts as a Molecular Switch from Tumor Surveillance to Tumor Promotion. *Cancer Discov.* 2016;6(4):414-29.
142. Krzywinska E, Kantari-Mimoun C, Kerdiles Y, Sobiecki M, Isagawa T, Gotthardt D, et al. Loss of HIF-1alpha in natural killer cells inhibits tumour growth by stimulating non-productive angiogenesis. *Nat Commun.* 2017;8(1):1597.
143. Massena S, Christoffersson G, Vagesjo E, Seignez C, Gustafsson K, Binet F, et al. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood.* 2015;126(17):2016-26.
144. Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, Marone G, Iannone R, Marone G, et al. Are Mast Cells MASTers in Cancer? *Front Immunol.* 2017;8:424.
145. Starkey JR, Crowle PK, Taubenberger S. Mast-cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 1988;42(1):48-52.
146. McHale C, Mohammed Z, Deppen J, Gomez G. Interleukin-6 potentiates FcepsilonRI-induced PGD2 biosynthesis and induces VEGF from human in situ-matured skin mast cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018;1862(5):1069-78.
147. Sismanopoulos N, Delivanis DA, Alysandratos KD, Angelidou A, Vasiadi M, Therianou A, et al. IL-9 induces VEGF secretion from human mast cells and IL-9/IL-9 receptor genes are overexpressed in atopic dermatitis. *PLoS One.* 2012;7(3):e33271.

148. Abdel-Majid RM, Marshall JS. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *J Immunol.* 2004;172(2):1227-36.
149. Cao J, Papadopoulou N, Kempuraj D, Boucher WS, Sugimoto K, Cetrulo CL, et al. Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol.* 2005;174(12):7665-75.
150. McHale C, Mohammed Z, Gomez G. Human Skin-Derived Mast Cells Spontaneously Secrete Several Angiogenesis-Related Factors. *Front Immunol.* 2019;10:1445.
151. Tamura R, Tanaka T, Akasaki Y, Murayama Y, Yoshida K, Sasaki H. The role of vascular endothelial growth factor in the hypoxic and immunosuppressive tumor microenvironment: perspectives for therapeutic implications. *Med Oncol.* 2019;37(1):2.
152. Zalfa C, Paust S. Natural Killer Cell Interactions With Myeloid Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment and Implications for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2021;12:633205.
153. Hui G, Meng M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in women with ovarian cancer: A meta-analysis. *J BUON.* 2015;20(3):870-8.



154. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):1755-66.
155. Alfaro C, Suarez N, Gonzalez A, Solano S, Erro L, Dubrot J, et al. Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *Br J Cancer.* 2009;100(7):1111-9.
156. Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, et al. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol.* 2005;174(1):215-22.
157. Tran CW, Gold MJ, Garcia-Batres C, Tai K, Elford AR, Himmel ME, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha limits dendritic cell stimulation of CD8 T cell immunity. *PLoS One.* 2020;15(12):e0244366.
158. Ohm JE, Gabilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood.* 2003;101(12):4878-86.
159. Gavalas NG, Tsiatas M, Tsitsilonis O, Politi E, Ioannou K, Ziogas AC, et al. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *Br J Cancer.* 2012;107(11):1869-75.
160. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med.* 2015;212(2):139-48.

161. Courau T, Nehar-Belaid D, Florez L, Levacher B, Vazquez T, Brimaud F, et al. TGF-beta and VEGF cooperatively control the immunotolerant tumor environment and the efficacy of cancer immunotherapies. *JCI Insight*. 2016;1(9):e85974.
162. Rahma OE, Hodi FS. The Intersection between Tumor Angiogenesis and Immune Suppression. *Clin Cancer Res*. 2019;25(18):5449-57.
163. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol*. 2017;76:9 23 1-9 17.
164. Gonzalez-Vacarezza N, Alonso I, Arroyo G, Martinez J, De Andres F, A LL, et al. Predictive biomarkers candidates for patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab-containing regimen. *Drug Metab Pers Ther*. 2016;31(2):83-90.
165. Formica V, Palmirotta R, Del Monte G, Savonarola A, Ludovici G, De Marchis ML, et al. Predictive value of VEGF gene polymorphisms for metastatic colorectal cancer patients receiving first-line treatment including fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(2):143-51.
166. Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L, Cremolini C, Masi G, Frumento P, et al. Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2011;11:247.
167. Becouarn Y, Cany L, Pulido M, Beyssac R, Texereau P, Le Morvan V, et al. FOLFIRI(R) and bevacizumab in first-line treatment for colorectal cancer patients: safety, efficacy and genetic polymorphisms. *BMC Res Notes*. 2014;7:260.

168. Sibertin-Blanc C, Mancini J, Fabre A, Lagarde A, Del Grande J, Levy N, et al. Vascular Endothelial Growth Factor A c.\*237C>T polymorphism is associated with bevacizumab efficacy and related hypertension in metastatic colorectal cancer. *Dig Liver Dis.* 2015;47(4):331-7.
169. Loupakis F, Cremolini C, Yang D, Salvatore L, Zhang W, Wakatsuki T, et al. Prospective validation of candidate SNPs of VEGF/VEGFR pathway in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus bevacizumab. *PLoS One.* 2013;8(7):e66774.
170. Hansen TF, Carlsen AL, Heegaard NH, Sorensen FB, Jakobsen A. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2015;112(4):624-9.
171. Hansen TF, Christensen R, Andersen RF, Sorensen FB, Johnsson A, Jakobsen A. MicroRNA-126 and epidermal growth factor-like domain 7-an angiogenic couple of importance in metastatic colorectal cancer. Results from the Nordic ACT trial. *Br J Cancer.* 2013;109(5):1243-51.
172. Jary M, Vernerey D, Lecomte T, Dobi E, Ghiringhelli F, Monnier F, et al. Prognostic value of angiopoietin-2 for death risk stratification in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24(3):603-12.
173. Feng W, Wang Y, Zhu X. Baseline serum lactate dehydrogenase level predicts survival benefit in patients with metastatic colorectal cancer receiving

- bevacizumab as first-line chemotherapy: a systematic review and meta-analysis of 7 studies and 1,219 patients. *Ann Transl Med.* 2019;7(7):133.
174. Sohn BS, Park SJ, Kim JE, Kim KP, Hong YS, Suh C, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor pathway and outcomes of patients treated with first-line cytotoxic chemotherapy combined with bevacizumab for advanced colorectal cancer. *Oncology.* 2014;87(5):280-92.
175. Volz NB, Stintzing S, Zhang W, Yang D, Ning Y, Wakatsuki T, et al. Genes involved in pericyte-driven tumor maturation predict treatment benefit of first-line FOLFIRI plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(1):69-76.
176. Bianconi D, Herac M, Posch F, Schmeidl M, Unseld M, Kieler M, et al. Microvascular density assessed by CD31 predicts clinical benefit upon bevacizumab treatment in metastatic colorectal cancer: results of the PassionATE study, a translational prospective Phase II study of capecitabine and irinotecan plus bevacizumab followed by capecitabine and oxaliplatin plus bevacizumab or the reverse sequence in patients in mCRC. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12:1758835920928635.
177. Berger MD, Ning Y, Stintzing S, Heinemann V, Cao S, Zhang W, et al. A polymorphism within the R-spondin 2 gene predicts outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with FOLFIRI/bevacizumab: data from FIRE-3 and TRIBE trials. *Eur J Cancer.* 2020;131:89-97.

178. van Dijk E, van Werkhoven E, Asher R, Mooi JK, Espinoza D, van Essen HF, et al. Predictive value of chromosome 18q11.2-q12.1 loss for benefit from bevacizumab in metastatic colorectal cancer: A post hoc analysis of the randomized phase III-trial AGITG-MAX. *Int J Cancer*. 2022.
179. Marisi G, Scarpi E, Passardi A, Nanni O, Pagan F, Valgiusti M, et al. IL-8 and thrombospondin-1 as prognostic markers in patients with metastatic colorectal cancer receiving bevacizumab. *Cancer Manag Res*. 2018;10:5659-66.
180. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285(21):1182-6.
181. Tejpar S, Prenen H, Mazzone M. Overcoming resistance to antiangiogenic therapies. *Oncologist*. 2012;17(8):1039-50.
182. Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T, Sakai Y. Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer-Alterations to Anti-VEGF Pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
183. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2001;19(4):1207-25.
184. Cidon EU, Alonso P, Masters B. Markers of Response to Antiangiogenic Therapies in Colorectal Cancer: Where Are We Now and What Should Be Next? *Clin Med Insights Oncol*. 2016;10(Suppl 1):41-55.
185. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Sledge GW, Jr., Holmgren E, Benjamin R, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(3):843-50.

186. Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, Holmgren EB, Tobin P, Guerrero AS, et al. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(2):217-27.
187. Berk V, Deniz K, Bozkurt O, Ozaslan E, Karaca H, Inanc M, et al. Predictive Significance of VEGF and HIF-1alpha Expression in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Receiving Chemotherapy Combinations with Bevacizumab. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(14):6149-54.
188. Marien KM, Croons V, Martinet W, De Loof H, Ung C, Waelput W, et al. Predictive tissue biomarkers for bevacizumab-containing therapy in metastatic colorectal cancer: an update. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(3):399-414.
189. Loupakis F, Falcone A, Masi G, Fioravanti A, Kerbel RS, Del Tacca M, et al. Vascular endothelial growth factor levels in immunodepleted plasma of cancer patients as a possible pharmacodynamic marker for bevacizumab activity. *J Clin Oncol.* 2007;25(13):1816-8.
190. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, Boucher Y, Ancukiewicz M, Sahani DV, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. *J Clin Oncol.* 2009;27(18):3020-6.
191. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Curr Biol.* 2002;12(21):R745-52.

192. Masuyer G, Yates CJ, Sturrock ED, Acharya KR. Angiotensin-I converting enzyme (ACE): structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence. *Biol Chem.* 2014;395(10):1135-49.
193. Haiman CA, Henderson SO, Bretsky P, Kolonel LN, Henderson BE. Genetic variation in angiotensin I-converting enzyme (ACE) and breast cancer risk: the multiethnic cohort. *Cancer Res.* 2003;63(20):6984-7.
194. Bar J, Ding K, Zhao H, Han L, Laurie SA, Seymour L, et al. Angiotensin-Converting Enzyme and Aldosterone Serum Levels as Prognostic and Predictive Biomarkers for Cediranib in NCIC Clinical Trials Group Study BR.24. *Clin Lung Cancer.* 2015;16(6):e189-201.
195. Martin M, Loibl S, Hyslop T, De la Haba-Rodriguez J, Aktas B, Cirrincione CT, et al. Evaluating the addition of bevacizumab to endocrine therapy as first-line treatment for hormone receptor-positive metastatic breast cancer: a pooled analysis from the LEA (GEICAM/2006-11\_GBG51) and CALGB 40503 (Alliance) trials. *Eur J Cancer.* 2019;117:91-8.
196. Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity. *Glycoconj J.* 2012;29(8-9):619-25.
197. Sun Y, Peng P, He L, Gao X. Identification of lnc RNAs Related to Prognosis of Patients With Colorectal Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2020;19:1533033820962120.

198. Lu Y, Zhou X, Liu Z, Wang W, Lu S, Fu W. Prognosis Prediction for Colorectal Cancer Patients: A Risk Score Based on The Metabolic-Related Genes. *Int J Med Sci.* 2021;18(3):801-10.
199. Ahluwalia P, Mondal AK, Bloomer C, Fulzele S, Jones K, Ananth S, et al. Identification and Clinical Validation of a Novel 4 Gene-Signature with Prognostic Utility in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15).
200. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005;23(3):609-18.
201. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity.* 2016;44(3):698-711.
202. Bohaumilitzky L, Kluck K, Huneburg R, Gallon R, Nattermann J, Kirchner M, et al. The Different Immune Profiles of Normal Colonic Mucosa in Cancer-Free Lynch Syndrome Carriers and Lynch Syndrome Colorectal Cancer Patients. *Gastroenterology.* 2022;162(3):907-19 e10.
203. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 2016;23(3):253-9.
204. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer.* 2006;94(12):1823-32.



## ***XII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA***





Article

# Basal VEGF-A and ACE Plasma Levels of Metastatic Colorectal-Cancer Patients Have Prognostic Value for First-Line Treatment with Chemotherapy Plus Bevacizumab

M. José Ortiz-Morales <sup>1,2,3</sup>, Marta Toledano-Fonseca <sup>2,4</sup>, Rafael Mena-Osuna <sup>2,4</sup>, M. Teresa Cano <sup>1,2</sup>, Auxiliadora Gómez-España <sup>1,2,3</sup>, Juan R. De la Haba-Rodríguez <sup>1,2,3,4</sup>, Antonio Rodríguez-Ariza <sup>1,2,4,\*</sup> and Enrique Aranda <sup>1,2,3,4</sup>

- <sup>1</sup> Medical Oncology Department, Reina Sofía University Hospital, 14004 Córdoba, Spain; mariaj.ortiz.morales.sspa@juntadeandalucia.es (M.J.O.-M.); mteresa.cano.sspa@juntadeandalucia.es (M.T.C.); auxiliadora.gomez.sspa@juntadeandalucia.es (A.G.-E.); juanr.delahaba.sspa@juntadeandalucia.es (J.R.D.I.H.-R.); earandaa@seom.org (E.A.)
- <sup>2</sup> Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), 14004 Córdoba, Spain; marta.toledano@imibic.org (M.T.-F.); b72meosr@uco.es (R.M.-O.)
- <sup>3</sup> Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Córdoba, 14004 Córdoba, Spain
- <sup>4</sup> Cancer Network Biomedical Research Centre (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain
- \* Correspondence: antonio.rodriguez.exts@juntadeandalucia.es

**Citation:** Ortiz-Morales, M.J.; Toledano-Fonseca, M.; Mena-Osuna, R.; Cano, M.T.; Gómez-España, A.; Haba-Rodríguez, J.R.D.I.; Rodríguez-Ariza, A.; Aranda, E. Basal VEGF-A and ACE Plasma Levels of Metastatic Colorectal-Cancer Patients Have Prognostic Value for First-Line Treatment with Chemotherapy Plus Bevacizumab. *Cancers* **2022**, *14*, 3054. <https://doi.org/10.3390/cancers14133054>

Received: 23 May 2022

Accepted: 20 June 2022

Published: 21 June 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Molecular biology knowledge has enabled the incorporation of targeted therapies, such as the anti-angiogenic drug bevacizumab, into combined chemotherapy regimens for the treatment of metastatic colorectal cancer. However, to date, there are no reliable useful biomarkers to predict the efficacy of this anti-angiogenic therapy. The objective of this prospective study was to evaluate potential circulating plasma biomarkers in mCRC patients prior to the start of first-line treatment with chemotherapy plus bevacizumab. We found that high VEGF-A and low ACE plasma levels were associated with poor OS after treatment. Moreover, a simple scoring system combining both biomarkers efficiently stratified patients into high- or low-risk groups, which allows the selection of patients for anti-angiogenic therapy.

**Abstract:** The identification of factors that respond to anti-angiogenic therapy would represent a significant advance in the therapeutic management of metastatic-colorectal-cancer (mCRC) patients. We previously reported the relevance of VEGF-A and some components of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in the response to anti-angiogenic therapy in cancer patients. Therefore, this prospective study aims to evaluate the prognostic value of basal plasma levels of VEGF-A and angiotensin-converting enzyme (ACE) in 73 mCRC patients who were to receive bevacizumab-based therapies as a first-line treatment. We found that high basal VEGF-A plasma levels were significantly associated with worse overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). On the other hand, low ACE levels were significantly associated with poor OS. Importantly, a simple scoring system combining the basal plasma levels of VEGF-A and ACE efficiently stratified mCRC patients, according to OS, into high-risk or low-risk groups, prior to their treatment with bevacizumab. In conclusion, our study supports that VEGF-A and ACE may be potential biomarkers for selecting those mCRC patients who will most benefit from receiving chemotherapy plus bevacizumab treatment in first-line therapy. Additionally, our data reinforce the notion of a close association between the RAAS and the anti-angiogenic response in cancer.

**Keywords:** VEGF-A; angiotensin-converting enzyme; colorectal cancer; anti-angiogenic drug; bevacizumab; prognosis; biomarker

## 1. Introduction

Colorectal cancer is the second leading cause of cancer deaths in men and women worldwide, with an estimated incidence of 1.9 million new cases diagnosed in 2020 [1]. Survival rates for this disease depend on clinical, biological, and molecular prognostic factors, with median overall survival (OS) in metastatic disease exceeding 30 months [2,3].

The treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) requires multidisciplinary management, and molecular biology knowledge has enabled the incorporation of targeted therapies, such as anti-EGFR and anti-angiogenic drugs, into combined chemotherapy regimens [4,5]. In this regard, bevacizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody that inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF-A), which is important for angiogenesis signaling, commonly upregulated in mCRC [6,7]. Tumor progression in mCRC involves multiple molecular factors that modify the processes of cell proliferation, differentiation, and death [8]. In this context, the renin-angiotensin system (RAAS), which plays an important role in the relationships between the tumor microenvironment, the vasculature, and the immune system, has also been reported to participate in the process of tumor angiogenesis [9].

In the era of personalized medicine, the role of KRAS/NRAS mutational status as a predictor of resistance to anti-EGFR treatment in mCRC is widely known [10,11]. Likewise, in recent years, new predictive biomarkers of response in mCRC have emerged, such as microsatellite instability-high (MSI-H)/mismatch repair deficiency (dMMR) in immunotherapy [12]; mutation in BRAFV600E in the combination of anti-BRAF and anti-EGFR treatments [13]; and HER2 overexpression in anti-HER2 therapy [14]. However, to date, there are no reliable useful biomarkers to predict the efficacy of anti-angiogenic therapy in mCRC. Numerous studies have measured angiogenic factors in plasma and/or tumor tissue, to select the subgroup of patients who might benefit most [15]. Although there is evidence of a prognostic role for VEGF-A, no consistent data have been reported as a predictive factor, explaining why this biomarker has not been implemented in clinical practice [16–20].

Shedding light on these discrepancies, our group recently reported the results of the POLAF clinical trial [21], which supports the efficacy of FOLFIRI plus the anti-angiogenic drug aflibercept as a second-line treatment in mCRC, after the failure of oxaliplatin-based therapy; this suggests VEGF-A as a potential biomarker to predict better outcomes. On the other hand, we also previously reported that higher circulating levels of the angiotensin-converting enzyme (ACE) is associated with a better response to anti-angiogenic treatment with bevacizumab in breast- and colorectal-cancer patients [22].

Therefore, the objective of this study was to evaluate the prognostic value of basal VEGFA and ACE plasma levels of mCRC patients prior to the start of first-line treatment with chemotherapy plus bevacizumab.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

This is a prospective longitudinal observational study, with a total of 200 patients consecutively assessed before the initiation of standard first-line bevacizumab-based treatment, from March 2017 to December 2020, at the medical oncology department of the Reina Sofia University Hospital, Cordoba (Spain).

The inclusion criteria were: age > 18 years; histological confirmation of unresectable mCRC; ECOG < 2; good biochemical and hematological function; indication for first-line treatment including chemotherapy with bevacizumab. The exclusion criteria were: previous synchronous or metachronous neoplasms; ECOG ≥ 2; resectable disease; impossibility to evaluate response to treatment; indication for chemotherapy alone and/or added to anti-EGFR; no indication for bevacizumab due to uncontrolled arterial hypertension and/or proteinuria and/or high risk of bleeding; and impossibility of determining VEGF-A or ACE plasma levels.

Peripheral blood samples were collected from each patient prior to the administration of chemotherapy plus bevacizumab. Patients should have disease measurable by RECIST criteria [23], and response assessments were performed according to clinical practice, using CT scan, every three months and/or six cycles from the start of therapy. Treatment was continued until disease progression, the patient's decision to stop, or the appearance of unacceptable toxicity. In total, 73 mCRC patients were eligible for analysis. All samples were obtained after participants signed an informed written consent form to enter the study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Reina Sofia University Hospital, Córdoba (Spain) (protocol code PI16/01271, approved on 3 February 2017, act no. 260, ref. 3404), in accordance with the fundamental principles established in the 1964 Declaration of Helsinki and subsequent amendments.

## 2.2. Clinicopathological Variables

The analyzed clinicopathological characteristics of 73 patients (Table 1) included age, sex, stage, tumor location, degree of tumor differentiation, histological tumor type, RAS-BRAF mutational status, microsatellite status, number of metastatic sites, first-line chemotherapy treatment received, duration of treatment, response assessment, and grade toxicities. Toxicity was assessed throughout the study according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria.

**Table 1.** Clinical pathological data of patients.

Patient Characteristics		n (%)
Age (median, range)	62, 35–87	
Gender	Male	44 (60.3)
	Female	29 (39.7)
Localization	Right side	26 (35.6)
	Left side	47 (64.4)
Stage at diagnosis	Early stage	10 (12.7)
	Late stage	62 (84.9)
Histological subtype	Adenocarcinoma	64 (87.7)
	Mucinous/Ring cell	9 (12.4)
Histological grade	Well-differentiated	9 (12.3)
	Moderately differentiated	61 (86.6)
	Poorly differentiated	3 (4.1)
Primary tumor surgery	Yes	31 (42.5)
	No	42 (57.5)
ECOG at diagnosis	0	44 (60.3)
	1	29 (39.8)
Number of metastases	≤2	56 (76.7)
	>2	17 (23.3)
Liver metastases	Yes	33 (45.2)
	No	40 (54.8)
Lung metastases	Yes	16 (21.9)
	No	57 (78.1)
Peritoneal metastases	Yes	9 (12.3)
	No	64 (87.7)

RAS mutational status	Mutated	59 (80.8)
	Wild Type	13 (17.8)
	Unknown	1 (1.4)
BRAF mutational status	Mutated	5 (6.8)
	Wild Type	15 (20.5)
	Unknown	53 (72.6)
Microsatellite status	MSS	65 (89.0)
	MSI	2 (2.7)
	Unknown	6 (8.2)
First-line palliative chemotherapy	FOLFOX/XELOX–bevacizumab	63 (86.3)
	FOLFIRI–bevacizumab	3 (4.1)
	FOLFOXIRI–bevacizumab	4 (5.5)
	Capecitabine–bevacizumab	3 (4.1)
Response	Partial Response	40 (54.8)
	Stable disease	29 (39.7)
	Progression disease	4 (5.5)
First-line toxicity grade >2	Yes	21 (28.8)
	No	52 (71.2)
Second-line palliative chemotherapy	Yes	47 (64.4)
	No	26 (35.6)
Progression to first-line treatment	Yes	62 (84.9)
	No	11 (15.1)
Exitus	Yes	48 (65.8)
	No	25 (34.2)

### 2.3. Blood Collection and Plasma Separation

Plasma was obtained from 8 mL of blood collected using K2-EDTA tubes. Blood samples were centrifuged at 3.000× g for 10 min at 4 °C to separate plasma. Plasma samples were then aliquoted in Eppendorf tubes to avoid freeze–thaw cycles and stored at –80 °C until use.

### 2.4. Analysis of Circulating Markers in Plasma

The measurement of the analytes in plasma was performed using the following ELISA kits: VEGF-A human ELISA kit (ref: BMS277-2, Invitrogen) and ACE human ELISA Kit (ref: ab119577, Abcam). In each case, the analysis was performed following the instructions provided by the manufacturer.

### 2.5. Statistical Analysis

IBM SPSS Statistics for Macintosh (Version 20.0, IBM Corp, Armonk, NY, USA) was used for statistical analysis. Qualitative variables were compared using the chi-squared/Fisher’s exact tests. Quantitative variables were compared using the Mann–Whitney U test. The association with survival was analyzed using a Kaplan–Meier plot and log-rank test. Since no standardized cut-off points were available for the analytes deter-

mined in plasma, the statistical analysis was performed by stratifying our population according to tertiles. Multivariate analyses for OS and PFS were performed using the Cox proportional hazards model, adjusting by age, gender, ECOG at diagnosis, RAS status, primary tumor localization, and number and localization of metastases. The significance level for all the analyses was set at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Baseline Characteristics of Patients

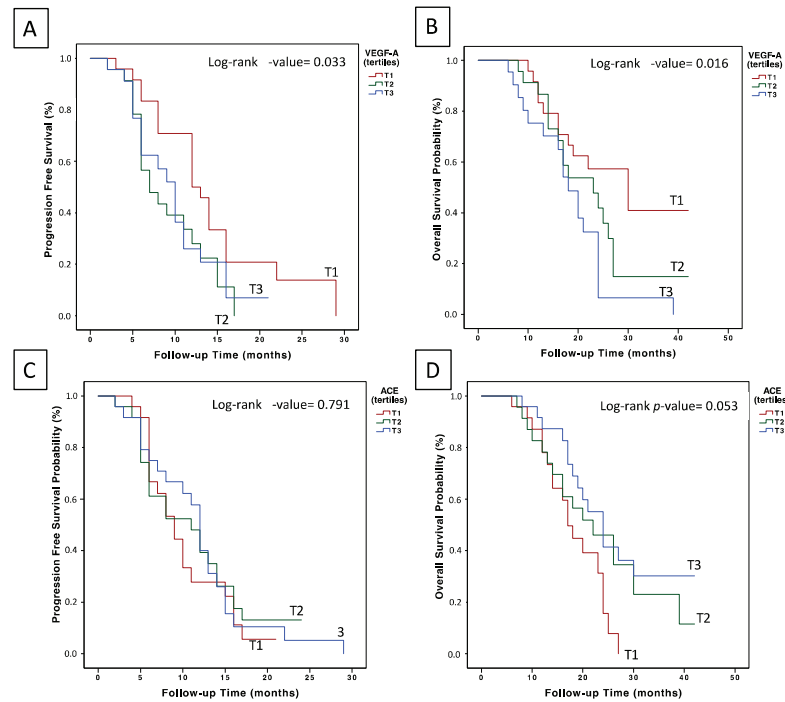
From March 2017 to December 2020, 200 patients with histological confirmation of mCRC prior to the initiation of standard first-line chemotherapy treatment including bevacizumab were screened for eligibility. Among these 200 patients, 46 received chemotherapy alone (unfit patients) and those not candidates for polychemotherapy); 38 received chemotherapy + anti-EGFR; 26 patients had resectable/potentially resectable disease; in 7 patients, it was not possible to determine plasma VEGFA and/or ACE; and 10 patients had a response not evaluable by RECIST criteria. As a result, 73 patients were finally included in the present study. The median follow-up time of the patients was 19 months (95% CI = 17.2–21.3).

The clinical–pathological characteristics of the patients are summarized in Table 1. The median age was 62 years, and most patients were male (60.3%). The most frequent histological subtype was adenocarcinoma (87.7%) and the majority of tumors were moderately differentiated (86.6%) and right-sided (64.4%). At diagnosis, 62 (84.9%) patients were stage IV, and 10 (12.7%) developed metastases during follow-up, with the liver being the most frequent site of metastasis (45.2%). Thirty-one (42.5%) patients underwent surgery for the primary tumor. Regarding molecular characteristics, 59 (80.8%) patients had a mutated RAS status, and 65 (89%) had stable microsatellites. The most-used chemotherapy regimen was oxaliplatin-based plus bevacizumab (86%), and 40 (54.8%) patients had a partial response. At the time of data analysis, 62 (84.9%) patients had progressed to first-line treatment and 48 (65.8%) had died.

According to the population tertiles, the cut-off points used for VEGF-A were T1:  $<0.1689$  ng/ml, T2:  $0.1690$ – $0.4407$  ng/ml, and T3:  $>0.4408$  ng/ml; and for ACE, they were T1:  $<79.48$  ng/ml, T2:  $79.49$ – $141.85$  ng/ml, and T3:  $>141.86$  ng/ml. No statistically significant associations were found between VEGF-A or ACE levels and the baseline characteristics of the patients (Table A1).

#### 3.2. Basal VEGF-A and ACE Plasma Levels of mCRC Patients Have Prognostic Value for First-Line Treatment with Chemotherapy Plus Bevacizumab

In relation to VEGF-A plasma levels prior to the initiation of treatment with chemotherapy plus bevacizumab, and with a median follow-up of 9 months (95% CI = 8.9–11.6), the median PFS for T1 was 14.1 months (95% CI = 11–17.2), 9.1 months for T2 (95% CI = 7.2–11) and 9.7 months for T3 (95% CI = 7.6–11.9) (log-rank  $p = 0.033$ ) (Figure 1A). Likewise, the median OS for T1 was 28.5 months (95% CI = 23.2–33.8), 22.6 months for T2 (95% CI = 18.1–27.1) and 18.3 months for T3 (95% CI = 14.6–22.1) (Log-rank  $p = 0.016$ ) (Figure 1B). In multivariate analysis adjusted for prognostic factors (Table 2), VEGF-A remained as an independent prognostic factor for first-line treatment with chemotherapy plus bevacizumab (OS T3 vs. T1: HR 4.28, 95% CI = 1.83–9.99,  $p = 0.001$ ; PFS T2 vs. T1: HR 2.15, 95% CI = 1.01–4.53,  $p = 0.045$ ; PFS T3 vs. T1: HR 2.64, 95% CI = 1.21–5.75,  $p = 0.014$ ).



**Figure 1.** Prognostic value of basal VEGF-A and ACE plasma levels in the first-line treatment of mCRC patients with chemotherapy plus bevacizumab: (A) effect of basal VEGF levels on PFS outcome; (B) effect of basal VEGFA levels on OS outcome; (C) effect of basal ACE levels on PFS outcome; and (D) effect of basal ACE plasma levels on OS outcome.

**Table 2.** Multivariate analysis of OS and PFS including tertiles of VEGF-A.

Variables	OS		PFS	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b>VEGF-A</b>				
T1	1 (ref.)		1 (ref.)	
T2	1.90 (0.85–4.30)	0.124	2.15 (1.02–4.54)	0.045
T3	4.28 (1.83–10.0)	0.001	2.64 (1.21–5.65)	0.014
Gender	0.60 (0.31–1.16)	0.130	1.12 (0.64–1.96)	0.685
Age	1.01 (0.97–1.05)	0.534	0.99 (0.96–1.02)	0.615
<b>ECOG</b>				
0	1 (ref.)		1 (ref.)	
1	2.32 (1.22–4.42)	0.010	2.11 (1.16–3.83)	0.014
RAS status	0.92 (0.40–2.11)	0.843	0.86 (0.43–1.71)	0.665



Localization of tumor				
Right	1 (ref.)		1 (ref.)	
Left	0.33	0.001	0.60	0.018
	(0.17–0.65)		(0.33–1.12)	
Number and localization of metastases	0.75	0.430	0.77	0.439
	(0.36–1.55)		(0.39–1.50)	

No statistically significant differences were observed in the PFS analysis of patients stratified according to ACE plasma level tertiles (Figure 1C). However, those patients with ACE plasma levels in the upper tertile (>141.86 ng/ml) had a median OS of 26.37 months (95% CI = 21.5–31.17), compared to patients in T2 (23.3 months, 95% CI = 18–28.6) and those in T1 (18.1 months, 95% CI = 15.5–20.7) (log-rank  $p = 0.053$ ) (Figure 1D). Additionally, when comparing ACE levels of T1 vs. T2 and T3, we found that overall survival was 18.1 months (95% CI = 15.5–20.7) and 25.0 months (95% CI = 21.3–28.5), respectively (log-rank  $p = 0.023$ ). Accordingly, in the multivariate Cox regression analysis adjusting for prognostic factors (Table 3), ACE plasma levels remained as an independent factor for OS (T3 vs. T1: HR 0.44, 95% CI = 0.21–0.93,  $p = 0.032$ ).

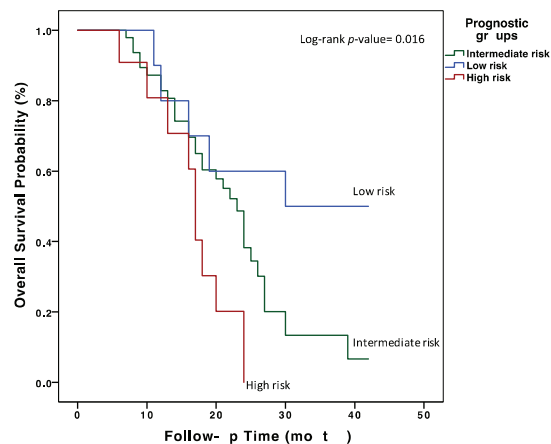
**Table 3.** Multivariate analysis of OS and PFS including tertiles of ACE.

Variables	OS		PFS	
	HR (95% CI)	$p$	HR (95% CI)	$p$
ACE				
T1	1 (ref.)		1 (ref.)	
T2	0.69	0.339	0.98	0.952
	(0.33–1.47)		(0.51–1.89)	
T3	0.44	0.032	0.95	0.879
	(0.21–0.93)		(0.50–1.80)	
Gender	0.67	0.231	1.05	0.863
	(0.35–1.29)		(0.60–1.84)	
Age	0.99	0.523	0.98	0.075
	(0.96–1.02)		(0.95–1.01)	
ECOG				
0	1 (ref.)		1 (ref.)	
1	2.14	0.021	1.97	0.025
	(1.12–4.07)		(1.09–3.58)	
RAS status	0.96	0.920	1.06	0.862
	(0.42–2.20)		(0.55–2.06)	
Localization of tumor				
Right	1 (ref.)		1 (ref.)	
Left	0.44	0.013	0.71	0.264
	(0.23–0.84)		(0.39–1.23)	
Number and localization of metastases	0.82	0.608	0.94	0.848
	(0.49–1.73)		(0.49–1.81)	

### 3.3. Combining VEGF-A and ACE Plasma Levels Stratifies mCRC Patients into High-Risk or Low-Risk Groups Prior to Their Treatment with Bevacizumab

Three prognostic risk groups were defined among the patients included in this study, according to ACE and VEGF-A tertiles: high risk (T1 ACE and T3 VEGF-A), intermediate risk (T2 ACE and T2 VEGF-A) and low risk (T3 ACE and T1 VEGF-A). High-risk patients

had a highly significant shorter median OS compared to low-risk patients (16.6 months (95% CI = 13.2–20.0) vs. 29.8 (95% CI = 21.7–37.9),  $p$ -value = 0.007) (Figure 2). No significant associations were found between these prognostic risk groups and the clinical pathological variables (Table A2). However, in the multivariate Cox regression analysis adjusting for prognostic factors (Table A3), the prognostic risk groups remained as independent factors for OS.



**Figure 2.** Overall survival analysis in first-line treatment of mCRC patients with chemotherapy plus bevacizumab according to basal VEGF-A and ACE plasma levels. Three prognostic risk groups were defined according to ACE and VEGF-A plasma level tertiles: high risk (T1 ACE and T3 VEGF-A), intermediate risk (T2 ACE and T2 VEGF-A) and low risk (T3 ACE and T1 VEGF-A).

#### 4. Discussion

Bevacizumab is a humanized monoclonal antibody that is indicated as first-line treatment for mCRC in combination with chemotherapy [5], and its mechanism of action is based on its ability to bind to VEGF protein, thereby inhibiting tumor angiogenesis [24]. The predictive value of numerous biomarkers of response to anti-angiogenic drugs in mCRC, which will allow the selection of those patients with the greatest benefit and impact on survival, has been previously reviewed in the literature [25,26]. However, although functional evidence exists, none of these potential biomarkers has been shown, so far, to possess clinical value; additionally, other studies have failed to reproduce their efficacy [16,20,27].

In our mCRC patient cohort, we found that those patients with low basal VEGF-A plasma levels had significantly better PFS and OS rates when treated with bevacizumab, independently of other prognostic factors. Additionally, those patients with low basal ACE plasma levels displayed significantly worse OS rates after treatment with bevacizumab. Accordingly, the subgroup of patients with low VEGF-A and high ACE levels showed a significantly better OS outcome, allowing us to establish prognostic risk groups for patients who were to receive this anti-angiogenic drug in first-line treatment.

Several studies have reported differing results on the correlation between plasma VEGF-A and outcomes in mCRC patients treated with bevacizumab [15,28]. However, the different VEGF-A assays used, as well as the fact that patients received heterogeneous chemotherapy regimens, make it difficult to interpret the results of these studies [15,29–31]. For instance, Marisi et al. [32] found no correlation between baseline VEGF-A mRNA expression and outcomes in a randomized trial of mCRC patients receiving chemotherapy with or without bevacizumab. However, the analysis was performed in total blood, and no VEGF-A protein circulating levels were obtained, making it difficult to compare the data with other studies.

In concordance with the data reported herein, we have recently shown that circulating VEGF-A in mCRC patients is a potential biomarker to predict better outcomes in second-line chemotherapy plus the anti-angiogenic drug aflibercept [21]. Specifically, efficacy was higher in patients with lower baseline plasma VEGF-A levels, suggesting VEGF-A as a potential biomarker to predict better outcomes following aflibercept plus FOLFIRI.

On the other hand, several studies have established an association between the RAAS and the process of angiogenesis in tumors [33]. Moreover, the arterial hypertension commonly observed during treatment with bevacizumab has been proposed as a possible biomarker of response to therapy [34,35]. ACE is a zinc metallopeptidase that catalyzes the conversion of angiotensin I to angiotensin II, playing a central role in the RAAS, which exerts important functions in the vascular system regulating blood pressure and water-electrolyte balance [36].

The interindividual variation in ACE levels in blood and tissues is mainly due to a common polymorphism in the ACE gene consisting of the insertion (I) or deletion (D) of a 287-bp fragment; moreover, it has been associated with risk for several diseases, including cancer [37,38]. In this regard, we have previously reported that I/D and D/D genotypes and higher (> 135 ng/mL) levels of circulating ACE were associated with better responses to bevacizumab treatment at any time point of the disease in metastatic breast cancer or CRC patients [22]. Accordingly, in the present study, we have now found that mCRC patients in the upper tertile of ACE (>141.86 ng/ml) prior to the initiation of treatment with bevacizumab had a significantly better OS.

Finally, herein, we report a novel prognostic classification based on basal VEGF-A and ACE plasma levels in mCRC patients who will receive chemotherapy and bevacizumab as first-line therapy. We have shown that low basal levels of VEGF-A and high basal levels of ACE are associated with significantly better survival rates (16.6 months (95% CI = 13.2–20.0) vs. 29.8 (95% CI = 21.7–37.9),  $p$ -value = 0.007). To our knowledge, this is the first study to identify VEGF-A and ACE as potential biomarkers for selecting those mCRC patients who will most benefit from receiving chemotherapy plus bevacizumab treatment in first-line therapy. Thus, our data propose the classification of patients with ACE levels > 141.86ng/mL and VEGFA levels < 0.168 ng/mL as the most favorable prognostic group prior to the initiation of first-line treatment. This information could be useful in clinical practice, improving cost-effectiveness and therapeutic outcomes, and avoiding unnecessary toxicities.

We recognize the limitations of our study, which must be considered when interpreting these results. First, this is an observational study with a limited sample size, and without a control group that would allow us to clarify the association of these biomarkers with the response to non-anti-angiogenic chemotherapy. Additionally, we performed an analysis based on tertiles, with the aim of differentiating the groups with the greatest benefit; however, standardized cut-off points for VEGF-A and ACE must be identified in future studies. More studies are warranted to explore the evolution of these biomarkers at critical points during disease progression to clarify their true predictive and prognostic values.

## 5. Conclusions

In summary, our study supports that VEGF-A and ACE may be useful biomarkers in the selection of mCRC patients for anti-angiogenic therapy. Additionally, our data reinforce the notion of a close association between the RAAS and the anti-angiogenic response in cancer. Further studies are needed to confirm these results and to implement the use of these biomarkers in clinical practice.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.R.-A. and E.A.; formal analysis, M.J. O.-M., funding acquisition, E.A.; investigation, M.J.O.-M., M.T.-F. and R.M.-O.; resources, M.J.O.-M.; M.T.C., A.G.-E. and J.R.D.L.H.-R.; supervision, A.R.-A. and E.A.; writing—original draft, M.J.O.-M. and A.R.-A.; writing—review and editing, M.J.O.-M., A.R.-A. and E.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded by the Instituto de Salud Carlos III, grant number: PI16/01271 (co-funded by the European Regional Development Fund/European Social Fund “Investing in your future”); the Fundación Científica Asociación Española contra el Cáncer, grant number: AECC14/002; the Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CB16/12/00349); and by the Alianza Mixta en Red Andalucía-Roche en Oncología Médica de Precisión. A.R.-A. has a researcher contract funded by the program “Nicolás Monardes” from Junta de Andalucía, Spain.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki, and previous approval was obtained from the Ethical Research Committee of Córdoba (Comité de Ética de la Investigación de Córdoba, CEI Córdoba, protocol code PI16/01271, approved on February 3, 2017, act no. 260, ref. 3404).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We would like to acknowledge the patients and their families for their participation in this study. Juan F. Alcalá-Díaz is greatly acknowledged for his technical help with the statistical analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## Appendix A

**Table A1.** Association between VEGF-A or ACE plasma levels and other clinical parameters.

	VEGF-A				ACE			
	T1	T2	T3	<i>p</i>	T1	T2	T3	<i>p</i>
Gender								
Male	19	11	12		14	14	16	
Female	5	12	11	0.058	11	10	8	0.727
Age								
>=60	6	8	12		9	9	10	
<60	18	15	11	0.150	16	15	14	0.915
Tumor localization								
Left	15	14	16		17	16	14	
Right	9	9	7	0.807	8	8	10	0.748
RAS mutational status								
Mutated	20	19	19		23	17	19	
Wild type	4	4	3	0.936	2	7	4	0.156
ECOG at diagnosis								
0–1	15	14	14		13	15	16	
>1	9	9	9	0.991	12	9	8	0.556
Num of metastases								
Single site	19	19	15		18	19	19	
Multiple	5	4	8	0.345	7	5	5	0.790

**Table A2.** Association between prognostic risk groups and the basal clinical parameters.

Patient Characteristic	Low Risk	Intermediate Risk	High Risk	p Value
	(n = 11)	(n = 48)	(n = 14)	
Age (median, range)	59(49–68)	63(60–66)	59(53–65)	0.237
Gender				
Male	9	27	8	0.284
Female	2	21	6	
Localization				
Right side	6	16	4	0.345
Left side	5	32	10	
Histological subtype				
Adenocarcinoma	9	42	13	0.856
Mucinous/Ring cell	2	6	1	
Primary tumor surgery				
Yes	5	20	8	0.634
No	3	24	6	
ECOG at diagnosis				
0	8	28	8	0.655
1	3	20	6	
Number of metastasis locations				
≤2	9	38	9	0.465
>2	2	10	5	
RAS mutational status				
Mutated	9	37	13	0.483
Wild Type	2	10	1	
BRAF mutational status				
Mutated	0	5	0	0.568
Wild Type	2	10	3	
Unknown	9	33	11	
Response first line				
Partial	5	26	9	0.802
Stable disease	5	19	5	
Progression disease	1	3	0	
Progression to first-line treatment				
Yes	11	40	11	0.288
No	0	8	3	
Exitus				
Yes	6	31	11	0.435
No	5	17	3	

**Table A3.** Multivariate analysis of OS including the prognostic groups defined according to ACE and VEGF-A plasma levels.

Variables	OS		PFS	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Prognostic Group				
Low	1 (ref.)		1 (ref.)	
Intermediate	0.46 (0.20–1.01)	0.054	0.79 (0.37–1.68)	0.541

High	0.14 (0.04–0.47)	0.001	0.56 (0.23–1.50)	0.246
Gender	0.60 (0.31–1.81)	0.140	1.04 (0.59–1.83)	0.881
Age	0.99 (0.96–1.04)	0.915	0.98 (0.95–1.01)	0.115
ECOG				
0	1(ref.)		1(ref.)	
1	2.24 (1.19–4.27)	0.014	2.01 (1.20–3.63)	0.021
RAS status	1.03 (0.42–2.49)	0.955	0.88 (0.44–1.78)	0.733
Localization of tumor				
Right	1 (ref.)			
Left	0.36 (0.19–0.71)	0.003	0.64 (0.35–1.18)	0.152
Number of metastases	0.78 (0.36–1.64)	0.514	0.91 (0.47–1.76)	0.782

## References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Venook, A.P.; Niedzwiecki, D.; Lenz, H.J.; Innocenti, F.; Fruth, B.; Meyerhardt, J.A.; Schrag, D.; Greene, C.; O'Neil, B.H.; Atkins, J.N.; et al. Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2017**, *317*, 2392–2401. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7105>.
- Heinemann, V.; von Weikersthal, L.F.; Decker, T.; Kiani, A.; Vehling-Kaiser, U.; Al-Batran, S.E.; Heintges, T.; Lerchenmuller, C.; Kahl, C.; Seipelt, G.; et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1065–1075. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70330-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70330-4).
- Saltz, L.B.; Clarke, S.; Diaz-Rubio, E.; Scheithauer, W.; Figer, A.; Wong, R.; Koski, S.; Lichinitser, M.; Yang, T.S.; Rivera, F.; et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 2013–2019. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9930>.
- Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2335–2342. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691>.
- Culy, C. Bevacizumab: Antiangiogenic cancer therapy. *Drugs Today* **2005**, *41*, 23–36. <https://doi.org/10.1358/dot.2005.41.1.875776>.
- Stefanini, M.O.; Wu, F.T.; Mac Gabhann, F.; Popel, A.S. Increase of plasma VEGF after intravenous administration of bevacizumab is predicted by a pharmacokinetic model. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9886–9894. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1419>.
- Sessa, C.; Guibal, A.; Del Conte, G.; Ruegg, C. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: Tools or decorations? *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2008**, *5*, 378–391. <https://doi.org/10.1038/ncponc1150>.
- Stockmann, C.; Schadendorf, D.; Klose, R.; Helfrich, I. The impact of the immune system on tumor: Angiogenesis and vascular remodeling. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 69. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00069>.
- Stec, R.; Bodnar, L.; Charkiewicz, R.; Korniluk, J.; Rokita, M.; Smoter, M.; Ciechowicz, M.; Chyczewski, L.; Niklinski, J.; Kozłowski, W.; et al. K-Ras gene mutation status as a prognostic and predictive factor in patients with colorectal cancer undergoing irinotecan- or oxaliplatin-based chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 1235–1243. <https://doi.org/10.4161/cbt.21813>.
- Asghar, U.; Hawkes, E.; Cunningham, D. Predictive and prognostic biomarkers for targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **2010**, *9*, 274–281. <https://doi.org/10.3816/CCC.2010.n.040>.
- Diaz, L.A., Jr.; Shiu, K.K.; Kim, T.W.; Jensen, B.V.; Jensen, L.H.; Punt, C.; Smith, D.; Garcia-Carbonero, R.; Benavides, M.; Gibbs, P.; et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): Final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol.* **2022**, *23*, 659–670. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00197-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00197-8).

13. Kopetz, S.; Grothey, A.; Yaeger, R.; Van Cutsem, E.; Desai, J.; Yoshino, T.; Wasan, H.; Ciardiello, F.; Loupakis, F.; Hong, Y.S.; et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1632–1643. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908075>.
14. Siena, S.; Di Bartolomeo, M.; Raghav, K.; Masuishi, T.; Loupakis, F.; Kawakami, H.; Yamaguchi, K.; Nishina, T.; Fakih, M.; Elez, E.; et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201) in patients with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (DESTINY-CRC01): A multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2021**, *22*, 779–789. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00086-3).
15. Jurgensmeier, J.M.; Schmoll, H.J.; Robertson, J.D.; Brooks, L.; Taboada, M.; Morgan, S.R.; Wilson, D.; Hoff, P.M. Prognostic and predictive value of VEGF, sVEGFR-2 and CEA in mCRC studies comparing cediranib, bevacizumab and chemotherapy. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 1316–1323. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.79>.
16. Mohamed, S.Y.; Mohammed, H.L.; Ibrahim, H.M.; Mohamed, E.M.; Salah, M. Role of VEGF, CD105, and CD31 in the Prognosis of Colorectal Cancer Cases. *J. Gastrointest. Cancer* **2019**, *50*, 23–34. <https://doi.org/10.1007/s12029-017-0014-y>.
17. Tsai, H.L.; Yang, I.P.; Lin, C.H.; Chai, C.Y.; Huang, Y.H.; Chen, C.F.; Hou, M.F.; Kuo, C.H.; Juo, S.H.; Wang, J.Y. Predictive value of vascular endothelial growth factor overexpression in early relapse of colorectal cancer patients after curative resection. *Int. J. Colorectal Dis.* **2013**, *28*, 415–424. <https://doi.org/10.1007/s00384-012-1570-z>.
18. Des Guetz, G.; Uzzan, B.; Nicolas, P.; Cucherat, M.; Morere, J.F.; Benamouzig, R.; Breau, J.L.; Perret, G.Y. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 1823–1832. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603176>.
19. Nanni, O.; Volpi, A.; Frassinetti, G.L.; De Paola, F.; Granato, A.M.; Dubini, A.; Zoli, W.; Scarpi, E.; Turci, D.; Oliverio, G.; et al. Role of biological markers in the clinical outcome of colon cancer. *Br. J. Cancer* **2002**, *87*, 868–875. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600569>.
20. Zheng, S.; Han, M.Y.; Xiao, Z.X.; Peng, J.P.; Dong, Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*, 1227–1230. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i6.1227>.
21. Elez, E.; Gomez-Espana, M.A.; Gravalos, C.; Garcia-Alfonso, P.; Ortiz-Morales, M.J.; Losa, F.; Diaz, I.A.; Grana, B.; Toledano-Fonseca, M.; Valladares-Ayerbes, M.; et al. Effect of aflibercept plus FOLFIRI and potential efficacy biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer: The POLAF trial. *Br. J. Cancer* **2022**, *126*, 874–880. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01638-w>.
22. Moreno-Munoz, D.; de la Haba-Rodriguez, J.R.; Conde, F.; Lopez-Sanchez, L.M.; Valverde, A.; Hernandez, V.; Martinez, A.; Villar, C.; Gomez-Espana, A.; Porras, I.; et al. Genetic variants in the renin-angiotensin system predict response to bevacizumab in cancer patients. *Eur. J. Clin. Investig.* **2015**, *45*, 1325–1332. <https://doi.org/10.1111/eci.12557>.
23. Therasse, P.; Arbuck, S.G.; Eisenhauer, E.A.; Wanders, J.; Kaplan, R.S.; Rubinstein, L.; Verweij, J.; Van Glabbeke, M.; van Oosterom, A.T.; Christian, M.C.; et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 205–216. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.3.205>.
24. Shin, S.J.; Hwang, J.W.; Ahn, J.B.; Rha, S.Y.; Roh, J.K.; Chung, H.C. Circulating vascular endothelial growth factor receptor 2/pAkt-positive cells as a functional pharmacodynamic marker in metastatic colorectal cancers treated with antiangiogenic agent. *Investig. New Drugs* **2013**, *31*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9817-7>.
25. Taieb, J.; Jung, A.; Sartore-Bianchi, A.; Peeters, M.; Seligmann, J.; Zaanen, A.; Burdon, P.; Montagut, C.; Laurent-Puig, P. The Evolving Biomarker Landscape for Treatment Selection in Metastatic Colorectal Cancer. *Drugs* **2019**, *79*, 1375–1394. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01165-2>.
26. Hansen, T.F.; Qvortrup, C.; Pfeiffer, P. Angiogenesis Inhibitors for Colorectal Cancer. A Review of the Clinical Data. *Cancers* **2021**, *13*, 1031. <https://doi.org/10.3390/cancers13051031>.
27. Tsai, H.L.; Lin, C.H.; Huang, C.W.; Yang, I.P.; Yeh, Y.S.; Hsu, W.H.; Wu, J.Y.; Kuo, C.H.; Tseng, F.Y.; Wang, J.Y. Decreased peritherapeutic VEGF expression could be a predictor of responsiveness to first-line FOLFIRI plus bevacizumab in mCRC patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 1900–1910.
28. Hegde, P.S.; Jubb, A.M.; Chen, D.; Li, N.F.; Meng, Y.G.; Bernaards, C.; Elliott, R.; Scherer, S.J.; Chen, D.S. Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 929–937. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2535>.
29. Longo, R.; Gasparini, G. Anti-VEGF therapy: The search for clinical biomarkers. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2008**, *8*, 301–314. <https://doi.org/10.1586/14737159.8.3.301>.
30. Martins, S.F.; Reis, R.M.; Rodrigues, A.M.; Baltazar, F.; Filho, A.L. Role of endoglin and VEGF family expression in colorectal cancer prognosis and anti-angiogenic therapies. *World J. Clin. Oncol.* **2011**, *2*, 272–280. <https://doi.org/10.5306/wjco.v2.i6.272>.
31. Murukesh, N.; Dive, C.; Jayson, G.C. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 8–18. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605483>.
32. Marisi, G.; Scarpi, E.; Passardi, A.; Nanni, O.; Ragazzini, A.; Valgiusti, M.; Casadei Gardini, A.; Neri, L.M.; Frassinetti, G.L.; Amadori, D.; et al. Circulating vegf and enos variations as predictors of outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving bevacizumab. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1293. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01420-0>.
33. Almutlaq, M.; Alamro, A.A.; Alamri, H.S.; Alghamdi, A.A.; Barhoumi, T. The Effect of Local Renin Angiotensin System in the Common Types of Cancer. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 736361. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.736361>.
34. Li, M.; Kroetz, D.L. Bevacizumab-induced hypertension: Clinical presentation and molecular understanding. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *182*, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.012>.

35. Carvalho, B.; Lopes, R.G.; Linhares, P.; Costa, A.; Caeiro, C.; Fernandes, A.C.; Tavares, N.; Osorio, L.; Vaz, R. Hypertension and proteinuria as clinical biomarkers of response to bevacizumab in glioblastoma patients. *J. Neurooncol.* **2020**, *147*, 109–116. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03404-z>.
36. Masuyer, G.; Yates, C.J.; Sturrock, E.D.; Acharya, K.R. Angiotensin-I converting enzyme (ACE): Structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence. *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 1135–1149. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0157>.
37. Zhang, Y.; He, J.; Deng, Y.; Zhang, J.; Li, X.; Xiang, Z.; Huang, H.; Tian, C.; Huang, J.; Fan, H. The insertion/deletion (I/D) polymorphism in the Angiotensin-converting enzyme gene and cancer risk: A meta-analysis. *BMC Med. Genet.* **2011**, *12*, 159. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-159>.
38. Afsar, B.; Afsar, R.E.; Ertuglu, L.A.; Kuwabara, M.; Ortiz, A.; Covic, A.; Kanbay, M. Renin-angiotensin system and cancer: Epidemiology, cell signaling, genetics and epigenetics. *Clin. Transl. Oncol.* **2021**, *23*, 682–696. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02488-3>.



Sociedad Española  
de Oncología Médica | SEOM

La Secretaría Técnica de **SEOM2022** que se celebrará del 18 al 21 de octubre de 2022 en Madrid, CERTIFICA que:

**María José Ortiz Morales**

Han presentado la comunicación titulada **Niveles circulantes de VEGF-A y ECA como biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta al tratamiento de primera línea basada en bevacizumab en el cáncer colorrectal metastásico**, seleccionada como Póster Destacado con el número PDEST-38.

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos el presente certificado en Madrid, 7 de septiembre de 2022.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo,

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)  
Velázquez, 7 - 3ª  
28001 Madrid

D. Javier de Castro Carpeño

Secretario General de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)

