

Títol del treball:

Biomarcadors moleculars no invasius pel càncer de pàncrees

Estudiant: Romana Mattioli Borrull

Grau en Biologia

Correu electrònic: romanamattioli@hotmail.com

Tutor: Dra. Rosa Peracaula Miró

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Dra. Rosa Peracaula Miró

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): rosa.peracaula@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 18 de juliol de 2018.

Agraïments

A la Doctora Rosa Peracaula Miró, tutora del treball de final de grau i professora que m'ha acompanyat durant dos anys de la carrera, per haver-me despertat més l'interès en la immunologia i haver-me brindat l'oportunitat d'aportar el meu granet de sorra amb aquest treball de revisió, en el grup d'investigació de "Bioquímica del Càncer" de la Universitat de Girona, concretament en la línia d'investigació referent a la glicosilació alterada en càncer de pàncrees.

A la Doctora Teresa Serra, tutora del pla d'acció tutorial, per haver-se encarregat del meu seguiment tots aquests anys.

Als meus amics, per haver-me donat ànims i forces per seguir endavant quan aquestes em mancaven.

Finalment, als meus pares, per haver-me donat la meravellosa oportunitat d'estudiar el que estimo i em fa feliç i per haver-me fet costat incondicionalment durant els anys de carrera, i sempre.

Resum

El càncer de pàncrees és un dels més letals que existeixen, especialment en països desenvolupats i la estadística preveu que la taxa de mortalitat segueixi augmentant fins a convertir-se en el segon càncer més mortífer.

La falta de controls rutinaris, la dificultat en la diagnosi, la ambigüitat de les tècniques d'imatge, la manca de tractaments clínics eficients -i, en general-, el desconeixement de la biologia d'aquest càncer són els motius principals que condueixen a una taxa de supervivència tant baixa.

L'únic biomarcador tumoral sèric emprat actualment és l'antigen carbohidrat 19-9 (CA19-9), el qual no és suficientment sensible ni específic per ser utilitzat com a mètode de diagnosi, sinó solament com a eina de monitoratge de la malaltia.

En les darreres dècades, molts d'estudis han cercat biomarcadors tumorals sensibles i específics detectables en fluids, que permetin realitzar un diagnòstic en estadi primerenc de la malaltia. Concretament, molts han optat per estudiar els patrons de glicosilació aberrants (alteracions en la composició o estructura dels glicans o en la densitat d'aquests en una proteïna) a partir d'estudis glicoproteòmics, ja que s'ha vist que juguen un paper important en el desenvolupament del càncer, promovent la invasivitat, la quimioresistència i modulant la resposta immunitària.

L'objectiu del present treball és discutir quines són les perspectives de futur més prometedores en el camp dels biomarcadors, encarant-ho als patrons de glicosilació alterats, per a la detecció del càncer de pàncrees.

S'han proposat molts candidats a ser marcadors òptims, dels quals destaquen glicoproteïnes com la RNase1, diverses proteïnes de fase aguda com la glicoproteïna àcida α -1, la haptoglobina o la fetuïna entre d'altres. Estudis més recents s'han centrat en les mucines, portadores d'antígens glucídics que es troben sobreexpressats en presència d'un tumor i en altres glicoproteïnes sèriques com leukemia inhibitory factor receptor (LIFR), centrosome-associated protein (CE350) i vacuolar protein sorting-associated protein 13A (VP13A), la glicosilació de les quals també s'ha trobat alterada en pacients de càncer de pàncrees. També s'ha estudiat la possibilitat de combinar diversos marcadors, concretament el CA19-9 amb CEA, CA125 o amb IGF-1 i albúmina.

Tot i els avenços, el descobriment de marcadors segueix sent un repte ja que no mostren suficient especificitat per discernir el càncer de pàncrees d'altres afectacions com la pancreatitis crònica.

Per aquest motiu, encara queda molt estudi i posteriors validacions a realitzar abans d'aconseguir implementar un nou biomarcador en clínica suficientment específic, sensible, no invasiu i econòmicament viable per a una detecció precisa i primerenca del càncer pancreàtic.

Resumen

El cáncer de páncreas es uno de los más letales que existen, especialmente en países desarrollados y la estadística prevé que la tasa de mortalidad siga aumentando hasta convertirse en el segundo cáncer más mortífero.

La falta de controles rutinarios, la dificultad en el diagnóstico, la ambigüedad de las técnicas de imagen, la falta de tratamientos clínicos eficientes -y, en general-, el desconocimiento de la biología de este cáncer son los motivos principales que conducen a una tasa de supervivencia tan baja.

El único biomarcador tumoral sérico empleado actualmente es el antígeno carbohidrato 19-9, el cual no es suficientemente sensible ni específico para ser utilizado como método de diagnóstico, sino solamente para monitorizar la enfermedad.

En las últimas décadas, muchos estudios han buscado marcadores tumorales sensibles y específicos detectables en fluidos, que permitan realizar un diagnóstico en estadio temprano. Muchos han optado por estudiar los patrones de glicosilación aberrantes (alteraciones en la composición o estructura de los glicanos o en la densidad de estos en una proteína) a partir de estudios glicoproteómicos, pues se ha visto que juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer, promoviendo la invasividad, la quimiorresistencia y modulando la respuesta inmunitaria.

El objetivo del presente trabajo es discutir cuáles son las perspectivas de futuro más prometedoras en el campo de los biomarcadores, centrándolo en los patrones de glicosilación alterados, para la detección del cáncer pancreático.

Se han propuesto muchos candidatos a ser marcadores óptimos, de los que destacan glicoproteínas como la RNase1, varias proteínas de fase aguda como la glicoproteína ácida α -1, la haptoglobina o la fetuína, entre otras. Estudios más recientes se han centrado en las mucinas, portadoras de antígenos carbohidratados que se encuentran sobreexpresados en presencia de un tumor, y en otras glicoproteínas séricas como leukemia inhibitory factor receptor (LIFR), centrosome-associated protein (CE350) y vacuolar protein sorting-associated protein 13A (VP13A), cuya glicosilación está también alterada en los pacientes con cáncer de páncreas. También se ha estudiado la posibilidad de combinar varios marcadores, concretamente el CA19-9 con CEA, CA125 o con IGF-1 y albúmina.

A pesar de los avances, el descubrimiento de marcadores sigue siendo un reto pues no muestran suficiente especificidad para discernir el cáncer de páncreas otras afectaciones como la pancreatitis crónica.

Todavía queda mucho estudio y posteriores validaciones a realizar antes de conseguir implementar un nuevo biomarcador en clínica suficientemente específico, sensible, no invasivo y económicamente viable para una detección precisa y temprana del cáncer pancreático.

Abstract

Pancreatic cancer is one of the most lethal types of cancer, especially in developed countries, and statistics predict that the mortality rate will continue increasing until it becomes the second deadliest cancer.

The lack of routine controls, the difficulty in diagnosis, the ambiguity of image techniques, the lack of efficient clinical treatments, and, -in general-, the lack of knowledge about this cancer biology are the main reasons that lead to such low survival rate.

The only serum tumour biomarker currently used is carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), which is not sensitive or specific enough to be used as a method of diagnosis, but only as a tool for monitoring the disease.

In recent decades, many studies have searched for sensitive and specific tumour biomarkers detectable in fluids, which would allow early diagnosis of the disease. Specifically, many scientists have chosen to study aberrant glycosylation patterns (alterations in the composition or structure of glycans or their density in a protein) from glycoproteomic studies, since they have been seen to play an important role in the development of cancer, promoting the invasiveness, chemoresistance and modulating the immune response.

The objective of this paper is to discuss the most promising future perspectives in the field of biomarkers, more specifically, addressing it to the altered glycosylation patterns, for the detection of pancreatic cancer.

Many candidates have been proposed to be optimal markers, which include glycoproteins such as RNase1, various acute phase proteins such as α -1 acid glycoprotein, haptoglobin or fetuin, among others. More recent studies have focused on mucins, which are carriers of carbohydrate antigens that are overexpressed in the presence of a tumour, and on other serum glycoproteins such as leukemia inhibitory factor receptor (LIFR), centrosome-associated protein (CE350) and vacuolar protein sorting-associated protein 13A (VP13A), which show an altered glycosylation pattern in pancreatic cancer patients. The possibility of combining several markers, specifically CA19-9 with CEA, CA125 or with IGF-1 and albumin has also been studied.

Despite the advances, the discovery of markers still remains a challenge as they do not show enough specificity to discern pancreatic cancer from other affections such as chronic pancreatitis.

For this reason, there is still much study and subsequent validations to be carried out before achieving a sufficiently specific, sensitive, non-invasive and economically affordable biomarker for a more precise and early detection of pancreatic cancer.

Índex

1. Introducció	2
1.1 Càncer de pàncrees.	2
1.2 Biomarcadors actuals pel càncer.....	4
1.3 Biomarcadors emprats per al càncer de pàncrees: antigen carbohidrat 19-9	6
1.4 Glicosilació alterada en càncer	7
2. Objectius.....	8
3. Metodologia	9
3.1 Recerca bibliogràfica	9
3.2 Ètica de treball.....	9
3.3 Glicoproteòmica	10
4. Resultats i discussió: estat actual i reptes futurs	12
4.1 Millores per a la detecció del càncer de pàncrees	12
4.2 Biomarcadors prometedors	13
4.3 Glicosilació alterada en càncer.....	14
4.4 Glicoproteïnes sobreexpressades en càncer de pàncrees: Proposta de possibles candidats a marcadors tumorals.....	16
5. Conclusions	20
6. Referències	21

1. Introducció

1.1 Càncer de pàncrees.

El terme càncer respon a una divisió anormal i descontrolada de cèl·lules –causada per mutacions gèniques i canvis epigenètics– que comparteixen l'habilitat d'envair i destruir els teixits sans que les rodegen (Makohon-Moore i Iacobuzio-Donahue, 2016).

Actualment el càncer és una de les malalties que més afecta a la població i que més morts causa a l'any a nivell mundial, i especialment en els països més desenvolupats, degut majoritàriament a l'estil de vida poc saludable, una major exposició a factors ambientals de risc i una major esperança de vida (ja que molts càncers s'expressen en persones d'avançada edat degut a una acumulació d'errors cel·lulars o mutacions) (Veisani, *et al.*, 2017).

El càncer de pàncrees o adenocarcinoma pancreàtic ductal, tot i presentar una incidència relativament baixa en la població (mundialment cada any se'n diagnostiquen al voltant d'uns 300.000, dels quals la gran majoria són persones d'edat avançada), és considerat un dels més letals en països desenvolupats (concretament el quart), xifra que es preveu que segueixi augmentant, arribant a convertir-se en el segon càncer més fatal als Estats Units per l'any 2020 segons les estadístiques realitzades per la American Cancer Society (Siegel, *et al.*, 2014).

A més, al ser un càncer present en un percentatge baix de la població, no hi ha un protocol de realització de controls rutinaris pels ciutadans (a diferència d'altres càncers més comuns com el de mama), fent disminuir encara més la possibilitat de detectar-lo a temps de ser tractat. (Herrerros-Villanueva i Bujanda, 2016).

Per fer-nos una idea del pronòstic general d'aquest tipus de càncer, segons les dades del projecte GLOBOCAN 2012 es va estimar que l'any 2012 van ser diagnosticats 338.000 pacients de càncer de pàncrees, dels quals 331.000 van morir en un marge de 5 anys posterior al diagnòstic (Ferlay *et al.*, 2015). Aquesta xifra suposa més del 95% dels pacients diagnosticats.

Els factors causants del càncer de pàncrees són encara majoritàriament desconeguts (Hidalgo, 2010). Tot i així, es creu que múltiples factors genètics, epigenètics i ambientals poden estar-hi relacionats –alguns estudis contempnen el consum excessiu d'alcohol o cafè, presentar pancreatitis crònica o patir diabetis mellitus – però solament s'ha trobat evidències que el relacionen amb el consum de tabac, concretament el risc de patir-lo varia entre 2,5 i 3,6 vegades més que en no fumadors i augmenta amb un major consum d'aquest (Hassan *et al.*, 2007). A més, com en la majoria de càncers, la predisposició a patir-lo també augmenta en pacients amb famílies on hi ha hagut altres casos de càncer de pàncrees, suggerint que hi ha un factor genètic rellevant implicat (Makohon-Moore i Iacobuzio-Donahue, 2016). A part, varis estudis han relacionat diverses vies significativament mutades que comporten errors en la transcripció gènica d'oncogens, per exemple, el cas més evident és el del gen KRAS, que s'ha trobat

mutat en un 90%-95% de pacients amb càncer de pàncrees en estat avançat de la malaltia. Aquest gen codifica per una GTPasa que es troba en la seva forma activa quan està unida a GTP, aleshores interacciona amb diversos efectors promovent l'activació de les rutes de senyalització de MPK i PI3K, encarregades de la proliferació i supervivència cel·lular. Al mutar KRAS, aquesta perd la seva funció d'hidrolitzar el GTP i la via RAS queda permanentment activa i la proliferació cel·lular és continua, donant lloc a un tumor. (Dunne i Hezel, 2015)

Per altra banda, també s'han detectat alteracions en gens que quan funcionen correctament, actuen com a supressors tumorals (com ara *CDKN2A*, *SMAD4* i *TP53*). Al mutar malmeten el correcte funcionament de la cèl·lula induint la formació d'un tumor maligne o càncer. Finalment, en menor mesura, s'han detectat mutacions en gens relacionats amb activitats de regulació cel·lular en general (creixement, maduració, reparació de ADN i apoptosi cel·lular). (Dunne i Hezel, 2015; Yabar i Winter, 2016).

També s'ha observat que l'origen ètnic, l'edat i el sexe són factors molt influenciadors (Veisani, *et al.*, 2017).

Segons l'estudi de Amundadottir *et al.* de 2009, hi ha una relació entre el grup sanguini del pacient i un increment en el risc de patir adenocarcinoma pancreàtic. S'opina que és degut a variacions genètiques en el locus ABO, determinant que els tipus A, B i AB presenten una major incidència respecte els pacients de tipus O (Amundadottir *et al.*, 2009).

La taxa de supervivència, calculada en els 5 anys següents a la detecció del tumor és del 5% en pacients que presenten metàstasi o etapa IV (etapa en la que es troben la major part dels pacients degut a que no es sol detectar fins aquest estat avançat de desenvolupament de la malaltia) (Herreros-Villanueva i Bujanda, 2016). Al tractar-se d'una malaltia que es diagnostica tard, els pacients tenen una esperança de vida mitja inferior a un any a partir del moment de la detecció (Foygel *et al.*, 2013).

Així doncs, la major part de pacients moriran a causa de metàstasis al fetge, pulmons i/o peritoneu, essent aquestes les dianes més comuns (Makohon-Moore i Iacobuzio-Donahue, 2016). La taxa de supervivència ascendeix a un escàs 20% si es detecta en fases més primerenques degut a l'escassa eficàcia dels tractaments.

Segons les bases de dades de la American Cancer Society, al comparar-lo per exemple, amb el càncer de mama, aquest, encara sent un tipus de càncer molt més freqüent, s'observa que presenta unes taxes de supervivència a distància de 5 anys molt més encoratjadores; si es detecta en fases primerenques la taxa de pacients que es recuperen és gairebé del 100%, mentre que si es detecta en la etapa IV tenen una taxa relativa de supervivència a 5 anys de d'aproximadament el 22% (American Cancer Society, 2017).

El motiu principal que condueix a una taxa de supervivència tant baixa en el càncer de pàncrees és el seu diagnòstic tardà, degut a que en fases primerenques no presenta una simptomatologia evident, en canvi, en fases més tardanes es comencen a presentar símptomes com són icterícia, dolor abdominal, pèrdua de pes i nàusees, entre d'altres (Kanji i Gallinger, 2013). Cal destacar que tots aquests símptomes, tot i ser presents en pacients amb càncer de pàncrees, no són exclusius d'aquesta patologia, pel que es poden confondre amb altres afectacions menys greus.

A més, actualment no existeix cap tècnica d'imatge suficientment precisa que permeti una detecció concloent del tumor, sinó que resulten ambigües: diferenciar l'adenocarcinoma pancreàtic d'altres masses degudes a una inflamació és extremadament difícil degut a la seva semblança. Aquesta ambigüitat és aplicable també als exàmens citològics per ultrasonografia endoscòpica (EUS-FNA) (Chang i Kundranda, 2017).

A tot això s'hi suma l'escàs tractament considerat clínicament vàlid per tractar als pacients i la falta de desenvolupament de noves teràpies més efectives. Avui dia, la opció de cura més vàlida és sotmetre al pacient a una operació quirúrgica, tot i que solament és possible en un 15%-20% dels pacients i no assegura l'èxit. Altres opcions són radioteràpia i quimioteràpia, però que actualment no són significativament exitoses, ja que aquestes són efectives solament en etapes primerenques dels càncers. A més, el càncer de pàncrees és un tipus de tumor altament resistent a la quimioteràpia i radioteràpia degut al microambient d'aquest, que conté un elevat component desmoplàstic, el qual dificulta que el medicament arribi a les cèl·lules cancerígenes. La teràpia dirigida i les teràpies immunològiques que mostren eficàcia en altres tipus de càncer encara no han mostrat ser beneficioses per aquest càncer, sinó que es presenten resistències innates o adaptatives als medicaments (Yabar i Winter, 2016).

Estudiar i conèixer els factors de risc que poden induir al desenvolupament de càncer de pàncrees podrien ajudar a deteccions més primerenques d'aquest i, per tant, suposarien un major nombre de pacients que es recuperen.

S'estima que si la detecció fos possible abans que el pacient presentés simptomatologies, la supervivència podria augmentar fins al 75% als 5 anys posteriors al diagnòstic (Herrerros-Villanueva i Bujanda, 2016).

1.2 Biomarcadors actuals pel càncer

Així doncs, per augmentar la taxa de supervivència enfront aquesta malaltia, és un fet unànim que la prioritat actual és trobar mètodes de diagnòstic que permetin una detecció del càncer en fase primerenca -quan encara és curable-, abans de l'inici dels símptomes associats a fases més tardanes.

L'esperança està enfocada en trobar biomarcadors moleculars no invasius (obtinguts a partir de mostres de sang, orina, saliva, excrements o suc pancreàtic) que donin suport a les tècniques de detecció utilitzades en l'actualitat (Herrerros-Villanueva i Bujanda, 2016).

Els biomarcadors comprenen una gran varietat de molècules endògenes (generalment proteïnes) que es sintetitzen en teixits tumorals o en altres teixits del cos en resposta a la presència d'un tumor o condicions associades a aquest, com ara una inflamació. A més, alguns processos relacionats a una tumorigènesi es poden emprar com a biomarcadors, per exemple, molècules derivades de processos d'apoptosi, angiogènesi o una proliferació cel·lular descontrolada. S'espera que aquests biomarcadors es trobin alterats respecte un pacient sa degut a la presència d'un teixit tumoral. D'aquesta manera poden ser utilitzats per a la detecció i monitoratge d'un càncer: la concentració en que es trobin o les modificacions estructurals que presentin respecte una mostra control sana representarien la presència d'un tumor, l'estat del càncer i fins i tot la funcionalitat de la teràpia administrada (Silva, 2015).

Les concentracions i modificacions dels biomarcadors poden ser detectades en fluids, com ara en sang, degut a la sobreexpressió gènica de cèl·lules tumorals que desencadena una traducció proteica anormal que acaba vessant fora les cèl·lules i entrant en circulació (Kulasingam i Diamandis, 2008).

Fins a la data, no s'ha trobat cap biomarcador universal que permeti detectar qualsevol tipus de càncer, de fet el que interessa és que siguin específics per a discernir un tipus de càncer concret. Tot i així, alguns biomarcadors actuals poden estar associats a més d'un tipus o a altres patologies que no són pròpiament càncer (Silva, 2015).

Així doncs, el biomarcador molecular òptim serà aquell que permeti realitzar un diagnòstic o complementar els diagnòstics primerencs realitzats amb ressonància d'imatge, biòpsies o altres tècniques de detecció, que sigui no-invasiu per al pacient, que resulti altament sensible i específic per a l'adenocarcinoma pancreàtic i que a més, sigui econòmicament assequible per a poder-lo normalitzar en l'àmbit clínic (Herrerros-Villanueva i Bujanda, 2016). Cal ser altament estricte amb la sensibilitat i la especificitat del biomarcador per evitar obtenir falsos negatius (no detectar un càncer) o falsos positius (per exemple, un tumor benigne).

Si compleix tots els requisits passarà per assajos clínics per tal de poder-lo validar i implementar en els centres hospitalaris (Silva, 2015).

Actualment, la gran majoria de biomarcadors de càncer (com ara el marcador CA72-4 per al càncer d'estómac o el CA15-3 per al càncer de pit) s'utilitzen per realitzar seguiments de la malaltia i prediccions de les respostes a un cert tractament (Pinho i Reis, 2015). En canvi, són limitats els que es poden emprar per a realitzar diagnòstics, ja que és difícil trobar-ne de suficientment sensibles i específics. Un exemple de biomarcador de diagnosi que s'utilitza actualment per a la detecció del càncer de

pròstata és el PSA (de l'anglès prostate-specific antigen), acompanyat d'un examen rectal (Kulasingam i Diamandis, 2008).

1.3 Biomarcadors emprats per al càncer de pàncrees: antigen carbohidrat 19-9

L'Antigen Carbohidrat 19-9 (o CA19-9) és el biomarcador molecular més àmpliament emprat clínicament per a monitoritzar el càncer de pàncrees (Silva, 2015). Va ser descrit per primera vegada l'any 1979 per Koprowski *et al.* treballant amb línies cel·lulars de càncer colorectal (Koprowski *et al.*, 1979) i posteriorment es va observar que també és present en altres teixits i en sèrum de pacients que presenten tumors al tracte gastrointestinal i òrgans associats com és el cas del pàncrees, entre d'altres (Kannagi, 2007).

Es tracta de l'antigen sialilat del grup sanguini Lewis (sialil-Le^a) (Figura 1), que és present en mucines i altres molècules d'adhesió que poden ser alliberades en sang. Concretament, en situacions tumorals, aquest marcador es troba sobreexpressat a la superfície de les cèl·lules tumorals i és alliberats al torrent sanguini per part d'aquestes cèl·lules (Goonetilleke i Siriwardena, 2007). El carcinoma desencadena una síntesi anormal d'aquestes molècules que es van acumulant a mesura que avança la malaltia, de manera que permeten un monitoratge de la progressió i de la resposta als tractaments (generalment quimioteràpia) (Ballehaninna i Chamberlain, 2012).

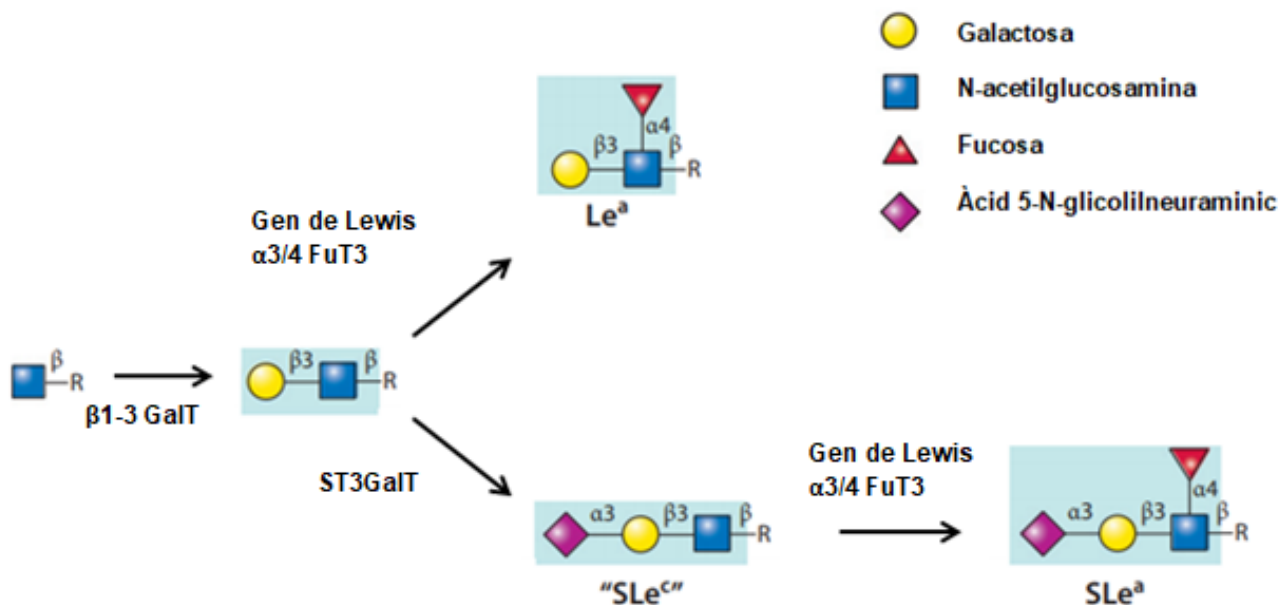


Figura 1. Procés bioquímic de formació de l'antigen Lewis a (Le^a) i de l'antigen Sialil-Le^a (SLe^a) o CA19-9. El gen de Lewis codifica per una fucosiltransferasa responsable de la síntesi de l'antigen de Lewis. Abreviacions: β1-3 GalT: β-1-3 galactosiltransferasa; α3/4 FuT3: α-1, 3/4 fucosiltransferasa 3; ST3GalT: α-2,3 sialiltransferasa. Extret i modificat de Stowell *et al.*, 2015.

Per a la detecció en sang d'aquest biomarcador s'utilitza l'anticòs monoclonal 1116 NS 19-9, el qual es va obtenir com a resposta immunològica per part de l'organisme de ratolins als que se'ls va injectar cèl·lules tumorals humanes de càncer colorectal, que sobreexpressaven l'antigen CA19-9 (Koprowski *et al.*, 1979).

Ara bé, cal destacar que entre el 5% i el 10% de la població, (però podent arribar fins al 40% depenent de l'origen ètnic) no tenen l'enzim glicosiltransferasa (concretament una α -1,3/4 fucosiltransferasa 3) que permet la síntesi de l'antigen de Lewis CA19-9 i, per tant, no se'ls podrà monitoritzar mitjanant aquest biomarcador, ja que no serà possible observar variacions del mateix en sang (Vestergaard *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2008). Intentar diagnosticar o monitoritzar aquests pacients amb l'antigen carbohidrat 19-9 suposaria obtenir falsos negatius letals per al pacient.

Així doncs, CA19-9 tot i ser el biomarcador en sèrum més estudiat i considerat clínicament vàlid, no és suficientment sensible ni específic; diversos estudis demostren que la seva sensibilitat i especificitat no són suficientment robustes per a utilitzar-lo com a mètode de diagnòstic de la malaltia, ja que no és totalment capaç de discernir el càncer de pàncrees d'altres afectacions a aquest òrgan, com ara la pancreatitis crònica, lesions cístiques benignes o altres patologies molt diverses no associades amb el pàncrees (Ballehaninna i Chamberlain, 2012). Concretament presenta una sensibilitat mitjana del 79% i una especificitat al voltant del 82% (Goonetilleke i Siriwardena, 2007) i que varia lleugerament segons l'estudi.

Aquest fet condueix a obtenir falsos positius, que són inconvenients per al pacient. És per aquest motiu que solament s'utilitza de forma complementaria a altres mètodes de diagnòstic –com són biòpsies, ecografies endoscòpiques o tècniques d'imatge com tomografies computeritzades–, per a monitoritzar la progressió de l'estat de la malaltia i fer pronòstics de la progressió d'aquesta (Kim *et al.*, 2014), però en cap cas s'utilitzarà per a fer un diagnòstic directament.

Al llarg dels últims anys, s'han estudiat diverses propostes que en un futur podrien ser emprades clínicament com a biomarcadors, (Chang i Kundranda, 2017) que seran degudament discutits en els apartats 4.2 i 4.4 de resultats i discussions del present treball.

1.4 Glicosilació alterada en càncer

Un altre camp que s'està explorant per a la detecció i monitoratge del càncer de pàncrees i que actualment ja s'utilitza per a altres tipus de tumors és la glicosilació alterada en càncer. De fet, la major part de marcadors utilitzats en clínica són glicoproteïnes.

La glicosilació és el procés enzimàtic que té lloc a l'aparell de Golgi i al reticle endoplasmàtic, pel qual es produeixen unions glicosídiques covalents entre un glicà

(sacàrid) amb una molècula acceptora que pot ser de naturalesa sacàrida, proteica o lipídica donant lloc a un glicoconjugat.

L'estudi del glicoma (conjunt de tots els glicans d'un organisme, ja siguin lliures o units a altres molècules) i glicoproteoma revela grans informacions sobre la biologia dels organismes (Pinho i Reis, 2015).

S'ha observat que les cèl·lules tumorals presenten en la seva superfície glicosilacions aberrants, és a dir, modificacions en els grups glicans que s'uneixen a les proteïnes o a altres molècules i que alteren la funció normal d'aquestes molècules. Així doncs, la glicosilació està implicada en la regulació de diversos processos fisiopatològics en els quals s'inclou la tumorigènesi pancreàtica, i alhora influencia en la progressió del càncer fins arribar a fer metàstasi a altres teixits del cos. A més, s'ha descrit que les glicosilacions aberrants estan relacionades amb la resposta immunològica i la quimioresistència (Pan, *et al.*, 2016).

És per aquest motiu que els patrons alterats de glicosilació associats al càncer en glicoproteïnes sèriques són considerats biomarcadors potencials. És de rellevant importància poder tenir una major comprensió dels canvis de glicosilació a nivell molecular en càncer de pàncrees i així poder emprar-los com a eines de diagnosi, monitoratge de la malaltia i fins i tot com a possibles tractaments mai explorats fins al moment.

2. Objectius

The aim of this study is to discuss the most promising future perspectives in the research field of biomarkers in pancreatic cancer, particularly emphasizing the markers based in altered glycosylation patterns.

For that, information about the current state of pancreatic cancer and the diagnostic methods used in clinics will be analysed. Then, the new scientific advances in the field of biomarkers especially focusing on glycoprotein analyses will be described and discussed as potential new biomarkers alone or in combination with the existing ones.

3. Metodologia

3.1 Recerca bibliogràfica

Per elaborar el present treball de revisió s'han utilitzat diversos portals d'Internet, als quals –sent usurari de la Universitat de Girona, en aquest cas com a estudiant– es pot accedir de forma gratuïta a través de la pàgina web de la Biblioteca de la Universitat de Girona. Aquests portals posen a disposició grans bases de dades que inclouen articles científics revisats i publicats, entre d'altres recursos electrònics. Els portals més utilitzats per realitzar la cerca d'informació han estat Elsevier, NCBI i PubMed.

Per contra, s'ha evitat extreure informació de portals no contrastats o no revistats degudament per revisors experts en el tema (peer review).

Per tal de trobar articles relacionats amb el tema a tractar, s'ha cercat a partir de paraules clau (preferiblement en anglès, ja que és la llengua més utilitzada en l'àmbit científic), com en aquest cas podrien ser *“pancreatic cancer, cancer biomarkers, pancreatic cancer diagnosis, CA19-9, aberrant glycosylation in pancreatic cancer, glycoproteomics in cancer”*.

A més, un cop s'ha identificat una sèrie d'articles d'interès, és convenient revisar les referències d'aquests articles per tal de trobar-ne d'altres de relacionats que també poden ser d'utilitat.

Finalment, tots els articles emprats han estat mencionats a l'apartat de referències del present treball i degudament referenciats al llarg del text. Per tal de referenciar correctament i seguint l'estil APA (de les sigles angleses “American Psychological Association”), s'ha utilitzat l'aplicació informàtica “Mendeley” i posteriorment s'ha revisat i editat manualment si ha escaigut.

En els apartats següents es comenten aspectes ètics en el camp de recerca dels biomarcadors (3.2) i algunes de les principals metodologies glicoproteòmiques per al descobriment de marcadors proteics que presentin glicosilacions aberrants en càncer (3.3).

3.2 Ètica de treball

Per tal de poder investigar i trobar nous biomarcadors moleculars més específics i sensibles, (en aquest cas, per al càncer de pàncrees, però aplicable per a qualsevol altre malaltia) és necessari tenir l'aprovació d'un comitè d'ètica hospitalari que assegura que els pacients donen les mostres per a la investigació de forma consentida i voluntària.

Per altra banda, és rellevant donar especial èmfasi en l'esforç d'investigació que s'està realitzant per tal d'identificar biomarcadors moleculars per a la detecció i monitoratge del càncer de pàncrees que resultin ser no invasius per a minimitzar l'impacte que puguin generar als pacients que pateixin aquesta malaltia i als que es sospita que la puguin tenir.

3.3 Glicoproteòmica

S'ha observat que les aberracions en els patrons de glicosilació relacionades amb càncer poden ser degudes a alteracions en la composició o estructura dels glicans, a un canvi en la densitat de glicosilació proteica o la combinació dels dos factors (Pan, *et al.*, 2016). Aquests canvis en la glicosilació influencien la proliferació del tumor i la invasió de teixits sans pel procés que es coneix com metàstasi. És per aquest motiu que són molècules convenients per a ser utilitzades com a biomarcadors per a realitzar diagnòstics, monitoratges de la patologia i, fins i tot, aturar o inhibir una glicosilació que s'observa alterada podria representar una potencial teràpia contra la progressió d'aquesta malaltia.

La glicoproteòmica és la disciplina que estudia les proteïnes que es troben glicosilades com a resultat de modificacions postraduccionals i cerca alteracions en els seus patrons que puguin estar associades amb el càncer. A partir de realitzar estudis quantitatiu del glicoproteoma sèric o de teixit pancreàtic, s'han pogut detectar canvis en els nivells de N-glicosilació de proteïnes secretades pel pàncrees de les quals es sap que estan relacionades amb processos neoplàsics (Pan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018).

Fins a dia d'avui, el mètode d'anàlisi que ha resultat ser més efectiu per detectar i quantificar els canvis que experimenten els glicans, les proteïnes i la interacció entre aquestes dues molècules en processos carcinogènics ha estat l'espectrometria de masses (Silva, 2015). Cal remarcar que l'anàlisi del glicoproteoma és molt més complex que l'anàlisi del proteoma. Això és degut a que en comparació amb l'estructura aminoacídica única d'una proteïna, hi ha una enorme diversitat de glicans que es poden formar al combinar-se els monosacàrids i diverses posicions per on es poden unir a una proteïna. A més, la glicosilació proteica és específica i diferent per cada teixit (Lis i Sharon, 1993).

Per tal de realitzar l'estudi es fa un glico-enriquiment de les mostres; l'estratègia més utilitzada per a realitzar-lo és utilitzant l'afinitat amb les lectines, ja que aquestes s'uneixen de forma força específica a estructures glucídiques determinades a partir de ponts d'hidrogen i forces de Van der Waals i d'aquesta manera es poden utilitzar per a seleccionar glicans que presenten una abundància baixa en la mostra (Drabik, *et al.*, 2017).

Seguidament es procedeix a l'anàlisi per espectrometria de masses (per exemple, mitjanant la tècnica 2D nanoLC-MS/MS) per detectar amb precisió les masses

moleculars de les diferents glicofomes i finalment se'n extreuen unes caracteritzacions a partir de tècniques bioinformàtiques (Pan, *et al.*, 2016).

Un altre tècnica per analitzar les glicosilacions a partir de l'enriquiment amb lectines és la cromatografia d'afinitat a les lectines (o LAC), consistent en immobilitzar les lectines sobre un suport sòlid d'agarosa en la columna de cromatografia i fer interaccionar la mostra a través d'aquesta columna de forma que els glicans quedin units segons la seva afinitat a les lectines immobilitzades. Seguidament s'elueixen de la columna amb un lligand que presenti una afinitat més alta per les lectines i es procedeix a realitzar una anàlisi amb electroforesi SDS-PAGE que permet identificar les proteïnes segons la seva massa molecular i finalment realitzar una anàlisi amb espectrometria de masses (nanoLC-MS/MS) de les bandes del gel d'electroforesi (Monzo *et al.*, 2007; Drabik, *et al.*, 2017). La figura 2 mostra aquestes dues tècniques esmentades.

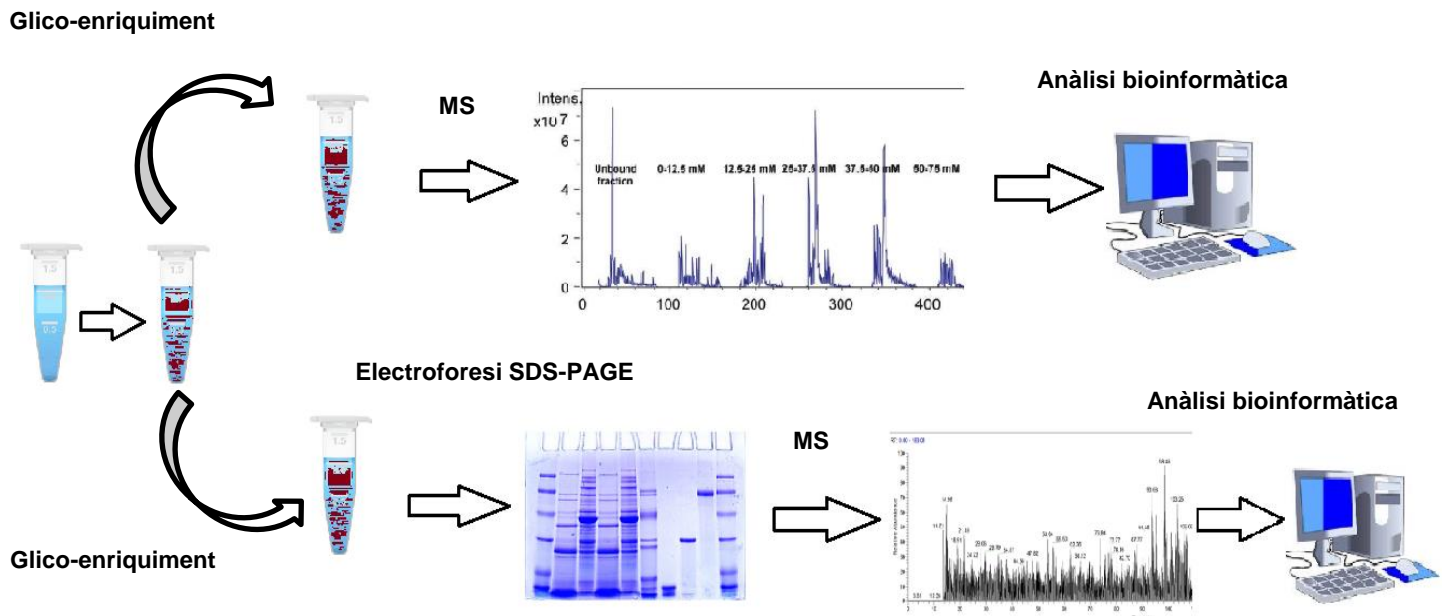


Figura 2. Esquema de la anàlisi proteòmica a partir d'espectrometria de masses. Extret i modificat de Drabik, *et al.*, 2017.

A més, per avaluar els biomarcadors, cal tenir en consideració que al comparar les mostres d'individus sans respecte individus amb càncer, cal ser molt precís amb que els pacients considerats "sans" realment ho siguin i que no es tracti d'individus que es trobin en un estadi previ a la malaltia (o qualsevol alteració com ara una inflamació), ja que podria influir en els paràmetres líndars del biomarcador (Silva, 2015).

4. Resultats i discussió: estat actual i reptes futurs

4.1 Millores per a la detecció del càncer de pàncrees

Actualment l'únic biomarcador molecular emprat per al càncer de pàncrees és l'antigen sialilat del grup sanguini Lewis (sialil-Le^a) o CA19-9. Aquest però, no permet pròpiament la detecció del tumor, sinó que solament és útil per al monitoratge de la progressió de la malaltia i per la resposta als tractaments contra aquest degut a que la seva sensibilitat i especificitat no permeten diferenciar el càncer d'altres patologies (Ballehaninna i Chamberlain, 2012).

Amb l'objectiu d'abaratir els costos de detecció actuals de l'antigen CA19-9, l'estudi de Coatrini *et al.* proposa un nou mètode de detecció de l'antigen CA19-9 a partir d'immunosensors basats en principis elèctrics o electroquímics. Aquests immunosensors de baix cost suposarien una major accessibilitat al diagnòstic en etapes més primerenques i, per tant, podrien ser crucials per augmentar la taxa de supervivència del càncer de pàncrees (Coatrini *et al.*, 2018).

Els estudis actualment però, per fer front a l'escassa taxa de supervivència que presenta el càncer de pàncrees, consideren primordial poder obtenir biomarcadors més específics i sensibles que el CA19-9, que permetin detectar el càncer abans de l'aparició dels símptomes propis de les fases tardanes. Sempre tenint en compte que siguin no invasius per al pacient i econòmicament viables.

A fi de millorar la sensibilitat i especificitat del biomarcador CA19-9, i per tant, obtenir una major robustesa de diagnòstic, en els darrers anys s'ha investigat la combinació d'aquest marcador amb d'altres. Per exemple, Duraker *et al.* a partir d'assajos immunoradiomètrics, van estudiar la possibilitat de combinar el biomarcador CA19-9 amb l'antigen carcinoembriònic (o CEA) i amb CA125; dos biomarcadors emprats per al monitoratge i pronòstic del càncer colo-rectal (Kulasingam i Diamandis, 2008) i d'ovari respectivament (Haglund, 1986).

Es va concloure que l'eficàcia no augmenta al utilitzar-los conjuntament, ja que si bé la sensibilitat sí que augmenta, la especificitat disminueix (Duraker *et al.*, 2007).

En un estudi més recent realitzat per Ferri *et al.*, es va determinar que a nivell experimental la sensibilitat i especificitat de l'antigen CA19-9 es veuen incrementades al combinar-lo amb altres biomarcadors. Concretament la combinació de CA 19-9, el factor de creixement insulínic tipus 1 (o IGF-1) i albúmina han resultat incrementar la sensibilitat de detecció fins a uns valors del 93,6% i una especificitat per discernir el càncer de pàncrees d'altres afectacions com és la pancreatitis crònica de fins al 95% (Ferri *et al.*, 2016). Una valors força més alts en relació als que presenta el marcador CA19-9 per sí sol, que són aproximadament del 79% i del 82% respectivament, segons les mitjanes de diversos estudis (Goonetilleke i Siriwardena, 2007).

Un altre exemple de combinatoria de marcadors que ha resultat ser exitosa i s'ha patentat recentment és la de Balasenthil *et al.* S'ha observat que el marcador plasmàtic inhibidor de la via del factor tissular (TFPI) i la tenascina C (TNC-FN III-C) afegeixen significança al marcador CA19-9 i la combinació dels tres permet una detecció més primerenca del càncer de pàncrees i alhora és un mètode suficientment específic per discernir-lo de la pancreatitis crònica (Balasenthil *et al.*, 2017).

Aquests resultats doncs, resulten molt encoratjadors per a la diagnosi i monitoratge del càncer de pàncrees en un futur i és important realitzar-ne ulteriors validacions per tal de poder-los implementar clínicament com a marcadors novells.

4.2 Biomarcadors prometedors

D'altra banda, a part de la combinació de biomarcadors, també s'ha estudiat la possibilitat de trobar biomarcadors nous no relacionats amb el CA19-9 que siguin més sensibles i específics per a aquest tipus de càncer, sempre prioritzant la no-invasivitat.

Els biomarcadors en sèrum que han resultat ser prometedors segons diverses línies d'investigació són, per exemple, els microARN (o miARN); fragments curts de ARN no codificant detectables en sang que intervenen en la regulació de l'expressió gènica i comunicació intracel·lular, que s'ha observat que durant els processos neoplàsics es mostren desregulats afectant processos relacionats amb la malaltia com ara angiogènesi, modulació de la resposta immunitària, metàstasi o quimioresistència (Schultz *et al.*, 2014; Kai, *et al.*, 2017). Tot i això, l'expressió aberrant del miARN pot ser deguda a altres patologies no relacionades amb el càncer (Iorio i Croce, 2009) i és per aquest motiu que seria necessari realitzar recerques ulteriors.

Una altra línia que diversos estudis han explorat és la d'utilitzar els patrons de metilació detectables en el suc pancreàtic com a biomarcador. La major part de metilacions del DNA tenen lloc a les citosines de les regions riques en citosines i guanines o CpG. Aquestes zones sovint corresponen a les regions promotores dels gens, de forma que una metilació aberrant resultaria en una desregulació de la transcripció del gen implicat i conseqüentment, en una desregulació del producte gènic (Chang i Kundranda, 2017). Concretament l'estudi de Yi *et al.* es centra en les regions promotores dels gens BNC1 i ADAMTS1, els quals es troben altament metilats en mostres de sèrum de pacients amb càncer de pàncrees en estadi I, fet que els converteix en potencials biomarcadors per detectar el càncer de pàncrees en estadis primerencs (Yi *et al.*, 2013).

Aquesta tècnica resulta prometedora tot i que fins al moment els patrons estudiats mostren sensibilitats relativament baixes i per tant, encara no s'han pogut considerar vàlids (Herreros-Villanueva i Bujanda, 2016).

Finalment, un mètode que s'ha començat a utilitzar en clínica per a realitzar pronòstics, monitoritzar la progressió de la malaltia o detectar recaigudes és el de les biòpsies

líquides, en que es busquen cèl·lules tumorals (circulating tumor cells o CTC) o fragments de ADN procedents de cèl·lules tumorals (circulating tumor DNA o ctDNA) que circulen en sang. Aquest mètode confereix l'avantatge de ser no invasiu respecte les biòpsies de teixit i conseqüentment poder-se repetir sovint a partir d'extraccions de sang (Crowley, *et al.*, 2013). En càncer de pàncrees però, és rar trobar cèl·lules tumorals en sang i el seu aïllament encara està en via d'estudi.

4.3 Glicosilació alterada en càncer

De forma natural, les cèl·lules presenten glicoproteïnes i glicolípidis a la superfície de la membrana cel·lular que contribueixen a mantenir una correcta activitat biològica de la cèl·lula; els glicans aporten una gran varietat de funcions estructurals i funcionals.

La glicosilació és una de les modificacions postraduccionalis més comuns que experimenten les proteïnes de membrana i les que són secretades per la cèl·lula. Les formes més comuns de glicosilació proteica són la O-glicosilació i la N-glicosilació. Tal com es pot observar en la figura 3, els O-glicans es troben units al grup hidroxil d'un residu de serina (Ser) o treonina (Thr), en el cas dels N-glicans, es troben units al nitrogen del grup amida de residus d'asparagina (Asn), concretament seguint la seqüència consens de "Asn-Xaa-Ser/Thr" on Xaa pot ser qualsevol aminoàcid exceptuant la prolina (Silva, 2015). Les diverses classes funcionals de glicoproteïnes difereixen en el nombre de N-glicans i O-glicans per polipèptid (Lau i Dennis, 2008).

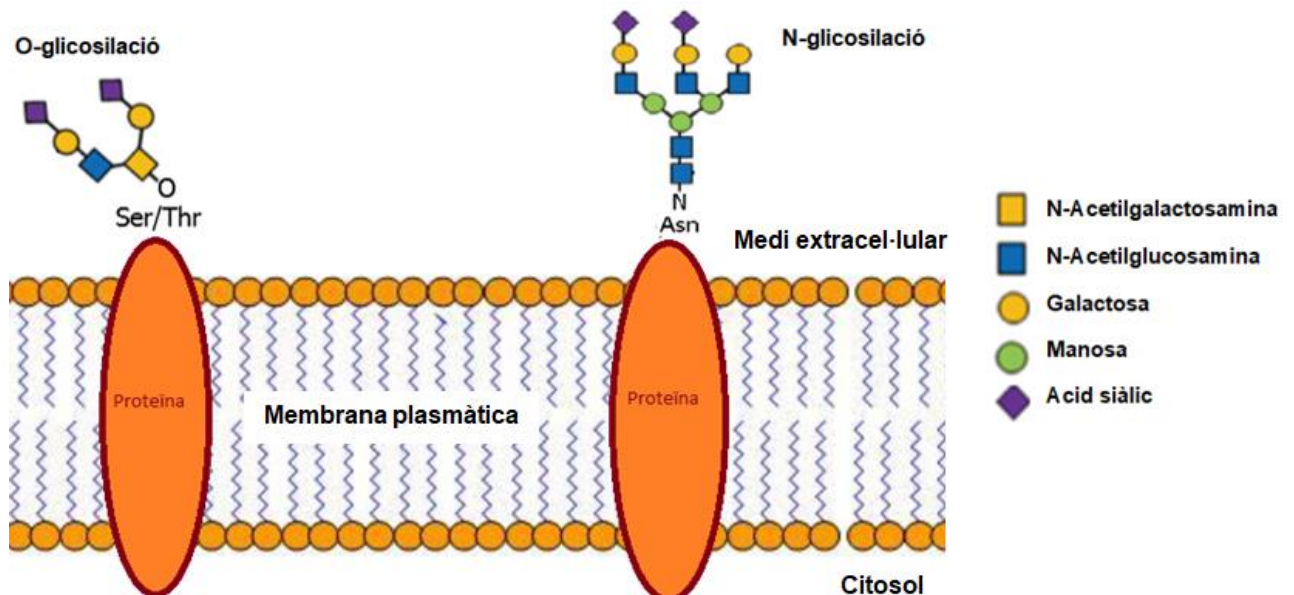


Figura 3. Formes de glicosilació proteica més comunes; O-glicosilació i N-glicosilació. Extret i modificat de Pan *et al.*, 2016.

S'ha observat que les cèl·lules tumorals presenten expressions alterades dels gens que regulen la glicosilació, fent que les glicosilacions es vegin alterades respecte la seva forma natural: el tipus de glicosilació (alteracions en la composició o estructura del grup glicà) i la densitat de glicans en una mateixa proteïna són factors que es poden veure alterats degut a canvis en rutes i processos cel·lulars que alhora derivin de malalties com ara un tumor maligne o càncer (Pan, *et al.*, 2016).

Aquest fet interfereix en l'activitat biològica cel·lular fent que s'alterin processos com ara la comunicació (particularment la adhesió entre cèl·lules) i senyalització cel·lular, les interaccions cèl·lula-matriu i promovent la invasió de teixits (Pinho i Reis, 2015). Tots aquests canvis influeixen en la tumorigènesi pancreàtica alterant la proliferació i els patrons de migració cel·lular i així la progressió del càncer, promovent la metastasi a diferents òrgans, alterant la resposta immunològica i promovent la quimioresistència (Pan, *et al.*, 2016).

L'expressió o estructura alterada dels glicans pot ser deguda a diversos factors. En primer lloc, es pot atribuir a la sobreexpressió o subexpressió de les glicosiltransferases –enzims encarregats d'unir els diferents monosacàrids per configurar el tipus de glicà– i en la localització d'aquestes en l'aparell de Golgi; els canvis en l'activitat de les glicosiltransferases o la deslocalització d'aquestes produeixen glicans immadurs. Un altre factor que pot alterar l'expressió dels glicans poden ser canvis en la conformació terciària del polipèptid, o bé en la cadena del propi grup glicà (Pinho i Reis, 2015).

Els canvis més evidents associats al desenvolupament i progressió del càncer que es produeixen en la glicosilació són un augment en els nivells de sialilació i fucosilació, la aparició d'antígens de Lewis en les glicoproteïnes, el truncament o escurament dels O-glicans i un augment en la ramificació de N-glicans (Pinho i Reis, 2015; Krishnan *et al.*, 2017).

Gràcies a la glicoproteòmica aquestes glicosilacions alterades associades al càncer s'estan començant a utilitzar com a marcadors tumorals, ja sigui per a detectar un càncer, monitoritzar-lo, fer pronòstics de la progressió o fins i tot per dissenyar teràpies –consistents en aturar aquests patrons de glicosilació alterats inhibint els enzims encarregats de dur a terme la glicosilació–, ajudant així a combatre la malaltia. Tot i així, avui dia encara es disposa d'una informació limitada sobre els canvis glicoproteòmics associats concretament al càncer de pàncrees.

Els motius principals d'aquesta falta de biomarcadors es deu a la complexitat i heterogeneïtat de la glicosilació i en la identificació i estudi de glicoproteïnes que resulten no ser suficientment específiques per discernir el càncer de pàncrees d'altres possibles afectacions (Krishnan *et al.*, 2017).

4.4 Glicoproteïnes sobreexpressades en càncer de pàncrees: Proposta de possibles candidats a marcadors tumorals

En els darrers anys molts investigadors han encarat els seus estudis en buscar glicoproteïnes, la glicosilació de les quals es trobi alterada degut a la presència d'un tumor i que puguin ser significativament eficients per a ser utilitzades com a biomarcadors per a detectar el càncer de pàncrees.

Les cèl·lules cancerígenes del pàncrees poden tenir origen en l'epiteli ductal o bé poden provenir de les cèl·lules acinars. Aquestes segones són les encarregades de produir i secretar enzims al fluid pancreàtic ductal, el qual, per tant, molt probablement contindrà proteïnes alliberades a partir de cèl·lules cancerígenes, fet que el converteix en objecte d'estudi proteòmic en la recerca de marcadors tumorals – que en última instància també es trobarien en el sèrum ja que es tracta d'una secreció exocrina – (Porterfield *et al.*, 2014). Posteriorment, la validació d'aquests marcadors es fa a partir de la seva detecció a través de molècules de detecció (com ara anticossos, lectines...) capaços de reconèixer les diferències entre els glicans i proteïnes de mostres de pacients amb càncer de pàncrees respecte pacients sans.

Una glicoproteïna que s'ha estudiat per a ser utilitzada com a marcador tumoral és la ribonucleasa pancreàtica humana (RNase1) en sèrum, sintetitzada i secretada principalment per les cèl·lules acinars del pàncrees i per les cèl·lules endotelials. Aquesta proteïna és secretada en sang tant en una situació normal com en una de tumoral, però analitzant la seva glicosilació s'ha observat que presenta fins a un 40% de fucosilació més en presència d'un càncer pancreàtic respecte la secreció considerada normal en pacients sans. D'aquesta manera, realitzant estudis ulteriors i desenvolupant nous mètodes més sensibles per a la detecció d'aquesta glicoproteïna, aquesta es podria arribar a emprar com a mètode de diagnòstic per al càncer de pàncrees (Barrabés, *et al.*, 2007).

L'estudi realitzat per Sarrats *et al.* l'any 2010 apunta que un grup de proteïnes anomenades “proteïnes de fase aguda”, degut a la seva glicosilació alterada, podrien ser emprades com a marcadors tumorals per al càncer de pàncrees. Aquestes proteïnes són generalment produïdes pels hepatòcits del fetge (i no pas pel pàncrees) (Porterfield *et al.*, 2014), es troben al plasma sanguini i es caracteritzen per variar la seva concentració en plasma (augmentant-la o disminuint-la) en resposta a un estímul inflamatori produït per citoquines.

Utilitzant anticossos específics contra les molècules glucídiques sialil Lewis X s'ha detectat un increment en els nivells del sialil Lewis X en la glicoproteïna àcida α -1 tant en mostres de pacients amb càncer de pàncrees com en mostres de pancreatitis.

A més, a partir de la seqüenciació dels N-glicans s'ha observat que si bé hi ha canvis en els nivells de N-glicosilació de diverses proteïnes de fase aguda (concretament en la glicoproteïna àcida α -1, haptoglobina, fetuïna, antitripsina α -1 i transferrina) en processos inflamatoris, és complicat discernir si és degut a la presència d'un càncer

pancreàtic o a pancreatitis crònica ja que ambdós processos comporten un procés inflamatori.

En la glicoproteïna àcida α -1 i la haptoglobina a més, s'ha determinat que presenta un increment significatiu en la fucosilació solament en el cas del càncer de pàncrees en estat avançat.

Totes aquestes glicoproteïnes són prometedores tot i no presentar una especificitat suficientment elevada per a emprar-se com a marcadors per sí soles (Sarrats *et al.*, 2010).

L'estudi de Foygel *et al.* es centra en l'anàlisi del teixit pancreàtic neoplàsic, concretament en la vasculatura d'un tumor o "neovasculatura", la qual difereix dels vasos sanguinis normals a nivell molecular i proteic. Detecten alts nivells d'expressió de la glicoproteïna de membrana de l'endoteli vascular THY1 o "antigen de diferenciació de timòcits 1", en comparació amb mostres de pancreatitis crònica o de teixit pancreàtic sa. La detecció d'aquest marcador es duu a terme amb agents que s'uneixen i amplifiquen la senyal de les proteïnes del teixit neovascular i es detecten a través de tècniques d'imatge per ultrasons, molt més precises que les tècniques utilitzades fins a l'actualitat per a la detecció del càncer de pàncrees. Actualment però, l'estudi només ha provat la seva eficàcia en ratolins transgènics que mimetitzen l'adenocarcinoma pancreàtic ductal humà (Foygel *et al.*, 2013).

Un proteïna que ha estat molt estudiada i s'ha determinat que experimenta canvis en la seva expressió i glicosilació durant els processos carcinogènics de diversos tipus de càncer són les mucines (Silva, 2015). De fet, el biomarcador CA19-9 utilitzat actualment per al monitoratge del càncer de pàncrees detecta l'epítop sialilat de Lewis A present en mucines.

Les mucines es sintetitzen a les cèl·lules epitelials i són components clau de la membrana cel·lular i sobretot en les secrecions mucoses. De forma natural, les mucines es troben sobretot altament O-glicosilades, tot i que en menor grau també experimenten N-glicosilació. En presència d'un tumor, la seva expressió normal i la seva glicosilació canvia: s'observa un increment dels nivells de fucosilació i dels d'antígens sialilats tipus T, Tn i de Lewis. Aquest canvi d'expressió s'ha observat que les implica en el desenvolupament del tumor, la invasivitat dels teixits, metàstasi i resistència als antibiòtics en el càncer de pàncrees. Per aquest mateix motiu s'estan estudiant per a fer-les servir de teràpia per a frenar els processos carcinogènics (Pan, *et al.*, 2016).

En un estudi recent s'ha analitzat la presència dels antígens sialilats sialil-Lewis X (SLe^x) i sialil-Tn (STn) en les mucines MUC1(mucina transmembrana) i MUC5AC (mucina de secreció) en teixit pancreàtic – les quals es sap que es troben sobreexpressades en processos neoplàsics – per a emprar-los futurament com a potencials biomarcadors per a detectar el càncer de pàncrees. S'ha observat que

aquests antígens no es detecten en teixit pancreàtic sa i en canvi, es troben expressats en càncer de pàncrees.

Concretament, en aquest estudi, els resultats més rellevants destaquen la presència de l'antigen SLe^x en MUC5AC en un 84% de les 25 mostres estudiades de teixit pancreàtic cancerigen, convertint-lo en el biomarcador més prometedor entre els analitzats (Balmaña *et al.*, 2018).

D'altra banda, en l'estudi de Drabik *et al.* de 2017, cercant canvis glicosídics en proteïnes en sèrum de pacients amb adenocarcinoma pancreàtic han trobat quatre proteïnes que presenten canvis en els seus N-glicans i que la seva detecció podria ser útil com a biomarcador. Aquestes proteïnes són la haptoglobina (HPT), el receptor del factor inhibidor de la leucèmia (leukemia inhibitory factor receptor o LIFR), la proteïna associada a centrosoma 350 (centrosome-associated protein o CE350) i la proteïna associada a la classificació de proteïnes vacuolàries 13A (vacuolar protein sorting-associated protein 13A o VP13A), totes elles portadores de N-glicans aberrants, absents en els grups control. Concretament, s'ha vist que la HTP presenta un augment en els nivells de fucosilació dels seus glicans. LIFR presenta un N-glicà addicional en el residu Asn-64. CE350, una proteïna que en pacients sans no apareix glicosilada, presenta glicosilació en el residu Asn-2336. Finalment, VP13A que en pacients sans tampoc es troba glicosilada, presenta glicosilació en el residu 877 de la proteïna en pacients amb càncer de pàncrees.

S'ha conclòs que, tot i ser relativament poc freqüent, trobar les 4 glicoproteïnes o almenys 3 d'aquestes en sèrum suposaria una sensibilitat i especificitat de diagnòstic de pràcticament el 100%, mentre que trobar-ne 2 no alteraria l'especificitat però disminuiria la sensibilitat fins a valors d'entre 67% i 95% en funció de quines proteïnes es detectessin, tal i com s'observa a la taula 1 (Drabik, *et al.*, 2017).

Taula 1. Realització de proves diagnòstiques que comprenen diversos perfils de glicosilació. Extret i modificat de Drabik, *et al.*, 2017.

Test	Proteïnes glicosilades	Sensibilitat	Especificitat
4 proteïnes	HPT, LIFR, CE350,VP13A	100%	100%
3 proteïnes	HPT, CE350, VP13A	100%	100%
	HPT, LIFR, CE350	95%	100%
	HPT, LIFR, VP13A	93%	100%
2 proteïnes	HPT, CE350	95%	100%
	LIFR, CE350	94%	100%
	HPT, VP13A	91%	100%
	LIFR, VP13A	79%	100%
	CE350, VP13A	77%	100%
	HPT, LIFR	67%	100%

Altres estudis investiguen sobre un grup de glicoproteïnes transmembrana que s'han considerat dianes d'estudi per a ser utilitzades com a marcador per a la detecció del càncer de pàncrees (entre d'altres tipus de càncer). Aquestes corresponen als receptors tirosin-quinasa de les cèl·lules, per exemple, el receptor del factor de creixement epitelial (EGFR). Una glicosilació aberrant té un impacte directe sobre la seva funcionalitat, i conseqüentment aquests es veuen implicats en el desenvolupament tumoral (Pan *et al.*, 2016). Els EGFR s'han considerat també com a possibles formes de teràpia contra el càncer –incloent el càncer de pàncrees– ja que són els desencadenants de la transducció del senyal de les cèl·lules i, en el cas de cèl·lules cancerígenes, desencadenen processos de proliferació i antiapoptòtics. D'aquesta manera, inhibint aquests EGFR alterats s'espera poder bloquejar el creixement cel·lular desmesurat típic dels processos neoplàsics (Contessa, *et al.*, 2008).

És un fet conegut que es donen glicosilacions aberrant en presència d'un càncer de pàncrees i són moltes les glicoproteïnes sèriques que s'han estudiat com a candidates a futurs biomarcadors tumorals a través de diverses tècniques de glicoproteòmica. També s'ha observat però, que les glicosilacions aberrants no solament es detecten en casos de càncer de pàncrees sinó que moltes vegades també són presents en casos de pancreatitis crònica, mostrant així les similituds moleculars que comparteixen aquestes dues malalties. És per aquest motiu que tots els estudis senyalen la importància de realitzar ulteriors estudis i validacions més àmplies per arribar a trobar glicofomes que siguin específiques del càncer de pàncrees, abans de poder implementar-les en clínica.

5. Conclusions

- The discovery of biomarkers remains still challenging and so far no biomarker has been found to be more specific and sensitive than biomarker CA19-9, which is still not specific or sensitive enough to be used as a diagnostic method, but instead it is used to monitor the progression of the disease.
- To combine CA19-9 with other potential biomarkers, –such as IGF-1 or albumin–, has shown an increase in specificity and sensitivity.
- Other molecules not related to CA19-9 have been studied to become potential biomarkers including miRNA, methylation patterns or circulating tumour cells detection.
- Glycosylation patterns of many relevant specific glycoproteins involved in cancer have been studied because these glycoproteins glycosylation happens to be altered during oncogenesis and glycoproteomics is the gateway to find promising biomarkers.
- Some glycoproteins found in serum have shown to be altered in pancreatic cancer including RNase1, some acute phase proteins (such as α -1-acid glycoprotein, haptoglobin, fetuin, α -1-antitrypsin and transferrin), mucins, leukemia inhibitory factor receptor (LIFR), centrosome-associated protein (CE350) and vacuolar protein sorting-associated protein 13A (VP13A). All of these glycoproteins could be used as potential serum biomarkers alone or in combination.
- There is still limited information about aberrant glycosylation changes associated with pancreatic cancer and it is necessary to focus more efforts and resources to achieve satisfactory results; not only to be able to monitor or diagnose cancer in early stages but also to be able to turn it into cancer treatment.
- Aberrant glycosylations found to date do not show enough specificity for pancreatic cancer.
- There is still a lot of study and subsequent validations to be performed in order to implement new pancreatic cancer specific biomarkers in clinics.

6. Referències

1. American Cancer Society. (2017). Comprensi3n de un diagn3stic de c3ncer de seno. Tasas de supervivencia del c3ncer de seno. Recuperat de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/comprension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tasas-de-supervivencia-del-cancer-de-seno.html#>
2. Amundadottir, L., Kraft, P., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Fuchs, C. S., Petersen, G. M., Arslan, A. A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Gross, M., Helzlsouer, K., Jacobs, E. J., LaCroix, A., Zheng, W., Albanes, D., Bamlet, W., Berg, C. D., Berrino, F., Bingham, B., Buring, J. E., Bracci, P. M., Canzian, F., Clavel-Chapelon, F., S., Clipp, S., Cotterchio, M., de Andrade, M., Duell, E. J., Fox Jr., J. W., Gallinger, S., Gaziano, J. M., Goggins, M., Gonz3lez, C. A., Hallmans, G., Holly, E. A., Jackson, R., Jenab, M., Klein, A. P., Li, D., Mandelson, M., Olson, S. H., Patel, A. V., Riboli, E., Thomas, G., Van Der Eden, S. K., Yu, H., Yu, K., Zeleniuch-Jacquotte, A., Chanock, S. J., Hartge, P., i Hoover, R. N. (2009). Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nature Genetics*, 41(9), 986–990. <https://doi.org/10.1038/ng.429>
3. Balasenthil, S., Huang, Y., Liu, S., Marsh, T., Chen, J., Stass, S. A., Kukuruga, D., Brand, R., Chen, N., Frazier, M. L., Lee, J.J., Srivastava, S., Sen, S., i McNeill Killary, A. (2017). A Plasma Biomarker Panel to Identify Surgically Resectable Early-Stage Pancreatic Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(8), 1–10. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw341>
4. Ballehaninna, U. K., i Chamberlain, R. S. (2012). The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(2), 105–119. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021>
5. Balmaña, M., Duran, A., Gomes, C., Llop, E., L3pez-Martos, R., Ortiz, M. R., Barrab3s, S., Reis, C.A., i Peracaula, R. (2018). Analysis of sialyl-Lewis x on MUC5AC and MUC1 mucins in pancreatic cancer tissues. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112(2017), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.148>
6. Barrab3s, S., Pag3s-Pons, L., Radcliffe, C. M., Tabar3s, G., Fort, E., Royle, L., Harvey, D. J., Moenner, M., Dwek, R. A., Rudd, P. M., De Llorens, R., i Peracaula, R. (2007). Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer. *Glycobiology*, 17(4), 388–400. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm002>

7. Chang, J. C., i Kundranda, M. (2017). Novel diagnostic and predictive biomarkers in pancreatic adenocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 4–6. <https://doi.org/10.3390/ijms18030667>
8. Coatrini, A., Coatrini, J., Makoto, F., da Cruz, V., Taj, I., Eliseo, M., Oliveira, M. H., Luiz, A., Manuel, R., Fregnani, J. H., Lopes, A., i Oliveira O. N. (2018). A simple architecture with self-assembled monolayers to build immunosensors for detecting the pancreatic cancer biomarker CA19-9. *Analyst*. <https://doi.org/10.1039/C8AN00430G>
9. Contessa, J. N., Bhojani, M. S., Freeze, H. H., Rehemtulla, A., i Lawrence, T. S. (2008). Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells. *Cancer Research*, 68(10), 3803–3809. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6389>
10. Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., i Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(8), 472–484. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.110>
11. Drabik, A., Bodzon-Kulakowska, A., Suder, P., Silberring, J., Kulig, J., i Sierzega, M. (2017). Glycosylation changes in serum proteins identify patients with pancreatic cancer. *Journal of proteome research*, 16 (4), 1436-1444. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00775>
12. Dunne, R. F., i Hezel, A. F. (2015). Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 29(4), 595–608. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.04.003>
13. Duraker, N., Hot, S., Polat, Y., Höbek, A., Gençler, N., i Urhan, N. (2007). CEA, CA 19-9, and CA 125 in the Differential Diagnosis of Benign and Malignant Pancreatic Diseases With or Without Jaundice. *Journal of Surgical Oncology*, 95(3), 142–147. <https://doi.org/10.1002/jso.20604>
14. Ferlay, J., Soerjomataram I, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., i Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
15. Ferri, M. J., Saez, M., Figueras, J., Fort, E., Sabat, M., López-Ben, S., de Llorens, R., Alexandre, R. N., i Peracaula, R. (2016). Improved pancreatic adenocarcinoma diagnosis in jaundiced and non-jaundiced pancreatic adenocarcinoma patients through the combination of routine clinical markers associated to pancreatic adenocarcinoma Pathophysiology. *PLoS ONE*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147214>

16. Foygel, K., Wang, H., MacHtaller, S., Lutz, A. M., Chen, R., Pysz, M., Lowe, A. W., Tian, L., Carrigan, T., Brentnall, T. A., i Willmann, J. K. (2013). Detection of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice by ultrasound imaging of thymocyte differentiation antigen 1. *Gastroenterology*, 145(4), 885–894. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.011>
17. Goonetilleke, K. S., i Siriwardena, A. K. (2007). Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, 33(3), 266–270. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.10.004>
18. Greaves, M., i Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306–313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
19. Haglund, C. (1986). Tumour marker antigen CA125 in pancreatic cancer: A comparison with CA19-9 and CEA. *British Journal of Cancer*, 54(6), 897–901. <https://doi.org/10.1038/bjc.1986.259>
20. Hassan, M. M., Bondy, M. L., Wolff, R. A., Abbruzzese, J. L., Vauthey, J. N., Pisters, P. W., Evans, D. B., Khan R., Chuou, T. H., Lenzi, R., Jiao, L., i Li, D. (2007). Risk factors for pancreatic cancer: Case-control study. *American Journal of Gastroenterology*, 102(12), 2696–2707. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01510.x>
21. Herreros-Villanueva, M., i Bujanda, L. (2016). Non-invasive biomarkers in pancreatic cancer diagnosis: what we need versus what we have. *Annals of Translational Medicine*, 4(7). <https://doi.org/10.21037/atm.2016.03.44>
22. Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 28(5), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.01.005>
23. Iorio, M. V., i Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer: Small molecules with a huge impact. *Journal of Clinical Oncology*, 27(34), 5848–5856. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.0317>
24. Kai, K., Dittmar, R. L., i Sen, S. (2017). Secretory microRNAs as biomarkers of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 78, 22-36 <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.011>
25. Kanji, Z. S., i Gallinger, S. (2013). Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Canadian Medical Association Journal*, 185(14), 1219–1226. <https://doi.org/10.1503/cmaj.121368>
26. Kannagi, R. (2007). Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung*

- Medical Journal*, 30(3), 189–209. Recuperat de <http://cgmj.cgu.edu.tw/3003/300301.pdf>
27. Kim, J. Y., Kim, S. H., i Kim, S. Y. (2014). Elevated serum CA 19-9 at screening tests: underlying conditions and role of abdominopelvic CT, 24(10), 2435–2448. <https://doi.org/10.1007/s00330-014-3262-2>
28. Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D., i Fuhrer, P. (1979). Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genetics*, 5(6), 957–971. <https://doi.org/10.1007/BF01542654>
29. Krishnan, S., Whitwell, H. J., Cuenco, J., Gentry-Maharaj, A., Menon, U., Pereira, S. P., Gaspari, M., i Timms, J. F. (2017). Evidence of altered glycosylation of serum proteins prior to pancreatic cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2670–2686. <https://doi.org/10.3390/ijms18122670>
30. Kulasingam, V., i Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5(10), 588–599. <https://doi.org/10.1038/ncponc1187>
31. Lau, K. S., i Dennis, J. W. (2008). N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology*, 18(10), 750–760. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn071>
32. Lis, H., i Sharon, N. (1993). Protein glycosylation: Structural and functional aspects. *European Journal of Biochemistry*, 218(1), 1–27. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18347.x>
33. Liu, Y., Wang, C., Wang, R., Wu, Y., Zhang, L., Liu, B.F., Cheng, L., i Liu, X. (2018). Isomer-specific profiling of N-glycans derived from human serum for potential biomarker discovery in pancreatic cancer. *Journal of Proteomics*, 181, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.016>
34. Makohon-Moore, A., i Iacobuzio-Donahue, C. A. (2016). Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 553–565. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.66>
35. Monzo, A., Bonn, G. K., i Guttman, A. (2007). Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.018>
36. Pan, S., Chen, R., Tamura, Y., Crispin, D. A., Lai, L. A., May, D. H., McIntosh M. W., Goodlett, D.R., i Brentnall, T. A. (2014). Quantitative Glycoproteomics Analysis Reveals Changes in N-glycosylation level associated with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Proteome Research*, 13(3), 1293–1306. <https://doi.org/10.1021/pr4010184>

37. Pan, S., Brentnall, T. A., i Chen, R. (2016). Glycoproteins and glycoproteomics in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(42), 9288–9299. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i42.9288>
38. Pinho, S. S., i Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>
39. Porterfield, M., Zhao, P., Han, H., Cunningham, J., Aoki, K., Von Hoff, D. D., Demeure, M. J., Pierce, J. M., Tiemeyer, M., i Wells, L. (2014). Discrimination between adenocarcinoma and normal pancreatic ductal fluid by proteomic and glycomic analysis. *Journal of Proteome Research*, 13(2), 395–407. <https://doi.org/10.1021/pr400422g>
40. Sarrats, A., Saldova, R., Pla, E., Fort, E., Harvey, D. J., Struwe, W. B., de Llorens, R., i Peracaula, R. (2010). Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Proteomics - Clinical Applications*, 4(4), 432–448. <https://doi.org/10.1002/prca.200900150>
41. Schultz, N. A., Dehlendorff, C., Jensen, B. V., Bjerregaard, J. K., Nielsen, K. R., Bojesen, S. E., Calatayud, D., Nielsen, S. E., Yilmaz, M., Holländer, N. H., Andersen, K. K., i Johansen, J. S. (2014). MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 311(4), 392–404. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.284664>
42. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., i Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 64(1), 9–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21208>
43. Silva, M. L. (2015). Cancer serum biomarkers based on aberrant post-translational modifications of glycoproteins: Clinical value and discovery strategies. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1856(2), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.07.002>
44. Stowell, S. R., Ju, T., & Cummings, R. D. (2015). Protein Glycosylation in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10(1), 473–510. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040438>
45. Veisani, Y., Jenabi, E., Khazaei, S., i Nematollahi, S. (2017). Global incidence and mortality rates in pancreatic cancer and the association with the Human Development Index: decomposition approach. *Public Health*, 156, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2017.12.015>
46. Vestergaard, E. M., Hein, H. O., Meyer, H., Grønnet, N., Jørgensen, J., Wolf, H., i Ørntoft, T. F. (1999). Reference values and biological variation for tumor marker CA 19-9 in serum for different Lewis and secretor genotypes and evaluation of secretor and Lewis genotyping in a Caucasian population. *Clinical Chemistry*, 45(1), 54–61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9895338>

47. Wong, D., Ko, A. H., Hwang, J., Venook, A. P., Bergsland, E. K., i Tempero, M. A. (2008). Serum CA19-9 decline compared to radiographic response as a surrogate for clinical outcomes in patients with metastatic pancreatic cancer receiving chemotherapy. *Pancreas*, 37(3), 269–274. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31816d8185>
48. Yabar, C. S., i Winter, J. M. (2016). Pancreatic Cancer: A Review. *Gastroenterology Clinics of North America*, 45(3), 429–445. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.04.003>
49. Yi, J. M., Guzzetta, A. A., Bailey, V. J., Downing, S. R., Van Neste, L., Chiappinelli, K. B., Keeley, B. P., Stark, A., Herrera, A., Wolfgang, C., Pappou, E. P., Iacobuzio-Donahe, C. A., Goggins, M. G., Herman, J. G., Wang, T. H., Baylin, S. B., i Ahuja, N. (2013). *Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer. Clinical Cancer Research*, 19(23), 6544-6555. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3224>