

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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



TESI DOCTORAL

**FACTORS PRONÒSTICS I PREDICTIUS EN
SARCOMES DE PARTS TOVES**

Doctoranda:

Anna Cristina Virgili Manrique

Directora:

Ana Sebio Garcia

Tutora:

Ariadna Tibau Martorell

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2025

A mi ángel de la guarda

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi doctoral no hagués estat possible sense el suport de tota la gent que m'envolta i m'ha donat suport en aquests 7 anys.

- Gracias Ana Sebio por compartir conmigo todo tu conocimiento, con paciencia infinita.
- Juliana Salazar, sense tu no ho hagués aconseguit, moltes gràcies per ensenyar-me a fer ciència.
- A tot l'equip d'Anatomia Patològica. Alberto Gallardo, muchas gracias por conseguir sacar tiempo para nosotras siempre con una sonrisa. Moltes gràcies Sílvia Bagué, per transmetre'm la teva passió pels sarcomes.
- Toño López-Pousa, gracias por dejarme aprender de ti.
- A tot el Comitè de Sarcomes de l'Hospital de Sant Pau, sou increïbles.
- Als companys del Servei d'Oncologia, tots heu aportat el vostre granet de sorra per permetre'm que aquesta tesi sigui una realitat. Gràcies Agustí Barnadas per confiar en mi sempre, David Páez porque pese a nuestras diferencias hacemos un gran team.
- A Ramon Manges i tot el seu grup, per donar-me un cop de mà sempre que ho he necessitat.
- A tota la gent que he conegut gràcies a la farmacogenètica. Pau Riera, sempre hi ets, gràcies. Elisabet del Rio, em vas ensenyar des de zero, sempre t'estaré agraïda.
- Als meus amics oncòlegs, gràcies per ser-hi sempre i comprendre'm. Andrés Barba, Ana Callejo, Marta Andrés, os quiero. Andrea i Núria, sou les millors co-R; Geòrgia i Cris, les millors R-grans.
- Als meus amics no-oncòlegs, de dins i fora del món de la medicina, gràcies per existir.
- A mi familia, que me han hecho quién soy. Papá, te quiero; tía, gracias por estar ahí siempre.
- Marta, la meva companya de vida, t'estimo.
- Júlia, gràcies per ordenar les prioritats de la vida.

LLISTAT ABREVIATURES

- AUC: àrea sota la corba
- CNV: variacions en el número de còpies – *copy number variation*
- DEL: delecions
- EORTC: *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*
- ESMO: *European Society for Medical Oncology*
- FNCLCC: *Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer*
- GEIS: Grupo Español de Investigación en Sarcomas
- Gy: *grays*
- HR: *hazard ratio*
- HSCSP: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
- INS: insercions
- INT *Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori*
- ISG: *Italian Sarcoma Group*
- MSC cèl·lules mare mesenquimals
- MSKCC: Memorial Sloan Kettering Cancer Center
- NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*
- OMS: Organització Mundial de la Salut
- OR: *odds ratio*
- QT: quimioteràpia
- RMN: Ressonància Magnètica Nuclear
- RT: radioteràpia
- SDF-1: *stromal cell-derived factor-1*
- SG: supervivència global
- SLM: supervivència lliure de malaltia
- SLP: supervivència lliure de progressió
- SLR: supervivència lliure de recaiguda
- SNP: *single nucleòtid polymorphism*
- SPT: sarcoma de parts toves
- Vs: *versus*

ÍNDIX TAULES

Taula 1 . Classificació OMS	20
Taula 2. Sarcomes de cariotip simple	22
Taula 3. Sarcomes de cariotip complex	23
Taula 4 . Classificació TNM	26

ÍNDIX FIGURES

Figura 1. Localització sarcomes de parts toves	19
Figura 2. Exemple biòpsia guiada per TC	24
Figura 3. Exemple RMN basal pacient dona de 21 anys diagnosticada de sarcoma sinovial monofàsic grau 3 de cuixa esquerra	25
Figura 4. Nomogrames de Supervivència Global i Disseminació a Distància	28
Figura 5. Exemple pacient home de 75 anys amb sarcoma pleomòrfic indiferenciat subcutani	29
Figura 6. Metabolisme de la doxorubicina	34
Figura 7. Metabolisme de la ifosfamida	35
Figura 8. Classificació dels polimorfismes de nucleòtid únic (SNP)	36
Figura 9. Funcions de les quimiocines i els seus receptors	38
Figura 10. Diagrama de flux dels pacients inclosos a l'estudi	79
Figura 11. Tinció CXCR4 en les mostres de biòpsia inicial, postractament neoadjuvant i a la recaiguda	81
Figura 12. Exemple de pacient dona de 46 anys amb diagnòstic de sarcoma sinovial ..	82

ÍNDIX

RESUM	15
ABSTRACT	17
1 INTRODUCCIÓ	19
1.1 SARCOMES DE PARTS TOVES	19
1.1.1 Classificació OMS	20
1.1.2 Classificació genòmica	22
1.1.3 Diagnòstic	24
1.2 FACTORS PRONÒSTICS EN SARCOMES DE PARTS TOVES	27
1.3 TRACTAMENT DE LA MALALTIA LOCALITZADA/ LOCORREGIONAL	29
1.3.1 Cirurgia	29
1.3.2 Radioteràpia	29
1.3.3 Quimioteràpia	30
1.4 OBJECTIUS DEL TRACTAMENT NEOADJUVANT	32
1.5 QUIMIOTERÀPIA AMB ANTRACICLINES – IFOSFAMIDA. El paper de la farmacogenètica en la identificació de biomarcadors predictius de resposta al tractament	33
1.5.1 Antraciclins: doxorubicina i epirubicina	33
1.5.2 Ifosfamida	34
1.5.3 Farmacogenètica de la quimioteràpia neoadjuvant en els SPT	35
1.6 NOUS FACTORS PRONÒSTICS EN ELS SPT. Les citoquines com a biomarcadors en sarcomes	37
2 HIPÒTESIS	41
3 OBJECTIUS	43
3.1 OBJECTIU PRINCIPAL	43
3.2 OBJECTIUS SECUNDARIS	43

4	COMPENDI DE PUBLICACIONS	45
4.1	Article 1	47
4.2	Article 2	65
5	RESUM GLOBAL DELS RESULTATS	79
6	RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ	83
6.1	Estudi farmacogenètic	83
6.2	Estudi CXCR4	86
6.3	Limitacions	88
7	CONCLUSIONS	91
8	LÍNIES DE FUTUR	93
9	BIBLIOGRAFIA	95

RESUM

Els sarcomes de parts toves (SPT) són tumors mesenquimals malignes amb múltiples subtipus histològics i un alt potencial de metastatitzar. En SPT localitzats d'extremitats i tronc es pot proposar tractament neoadjuvant de quimioteràpia basada en antraciclins i/o ifosfamida en base als factors de risc establerts com són la mida, la profunditat, el grau i la histologia.

Amb l'objectiu d'identificar possibles biomarcadors pronòstics o predictius de resposta i/o supervivència a quimioteràpia neoadjuvant en pacients amb SPT d'extremitats localitzats, es van plantejar dos estudis. En el primer es van analitzar variants farmacogenètiques de gens implicats en el metabolisme d'antraciclins i/o ifosfamida; es va observar que 2 polimorfismes en el gen *ABCC2* (rs3740066 i rs22736097) es relacionaven amb major toxicitat i amb pitjor supervivència en pacients tractats amb antraciclins i un polimorfisme al gen *ALDH1A1* (rs3764435) s'associava a pitjor pronòstic en pacients que rebien ifosfamida neoadjuvant. En el segon estudi es va analitzar l'expressió de CXCR4 per immunohistoquímica com a biomarcador pronòstic abans i després de tractament neoadjuvant; els resultats mostren que l'expressió de CXCR4 identifica un subgrup de mal pronòstic, especialment en sarcomes sinovials i sarcomes pleomòrfics indiferenciats.

Aquests resultats són encoratjadors per continuar investigant en la línia de recerca de biomarcadors pronòstics i predictius de toxicitat i resposta als tractaments en SPT, i així avançar en el desenvolupament i l'aplicació de la medicina personalitzada en oncologia.

ABSTRACT

Soft tissue sarcomas (STS) are malignant mesenchymal tumours with multiple histological subtypes and a high potential to metastasize. In localised STS of the extremities and trunk, neoadjuvant anthracycline and/or ifosfamide-based chemotherapy treatment can be proposed based on established risk factors such as size, depth, grade and histology.

To identify possible prognostic or predictive biomarkers of response and/or survival to neoadjuvant chemotherapy in patients with localised STS of the extremities, two studies were proposed. In the first, pharmacogenetic variants of genes involved in the metabolism of anthracyclines and/or ifosfamide were analysed; it was observed that two polymorphisms in the *ABCC2* gene (rs3740066 and rs22736097) were associated with higher toxicity and worse survival in patients treated with anthracyclines and a polymorphism in the *ALDH1A1* gene (rs3764435) was associated with worse prognosis in patients receiving neoadjuvant ifosfamide. In the second study, CXCR4 expression was analysed by immunohistochemistry as a prognostic biomarker before and after neoadjuvant treatment; the results show that CXCR4 expression identifies a poor prognostic subgroup, especially in synovial sarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas.

These results are encouraging for further research into prognostic and predictive biomarkers of toxicity and response to treatments in STS, and thus advance the development and application of personalised medicine in oncology.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. SARCOMES DE PARTS TOVES

Els sarcomes són un grup molt heterogeni de tumors malignes que provenen de les cèl·lules mesenquimàtiques. Es divideixen en dos grans grups, els Sarcomes Ossis i els Sarcomes de Parts Toves (SPT). En la última classificació de la Organització Mundial de la Salut (OMS), els tumors d'origen mesenquimal comprenen més de 100 subtipus histològics (1), segons les seves característiques morfològiques i immunohistoquímiques, així com les alteracions moleculars.

Són tumors rars, representen menys d'un 1% del total de neoplàsies malignes dels adults, amb una incidència a Europa entre 4-5 casos/100.000 persones/any (2), però molts cursen amb alta agressivitat, amb una mortalitat global d'aproximadament el 40% de tots els diagnòstics (3).

Des del punt de vista anatòmic, poden originar-se en qualsevol part del cos, sent els més freqüents aquells localitzats a les extremitats (especialment a la cuixa) seguits dels intraabdominals, ja siguin viscerals o retroperitoneals, i menys freqüentment al tronc o al cap i coll.

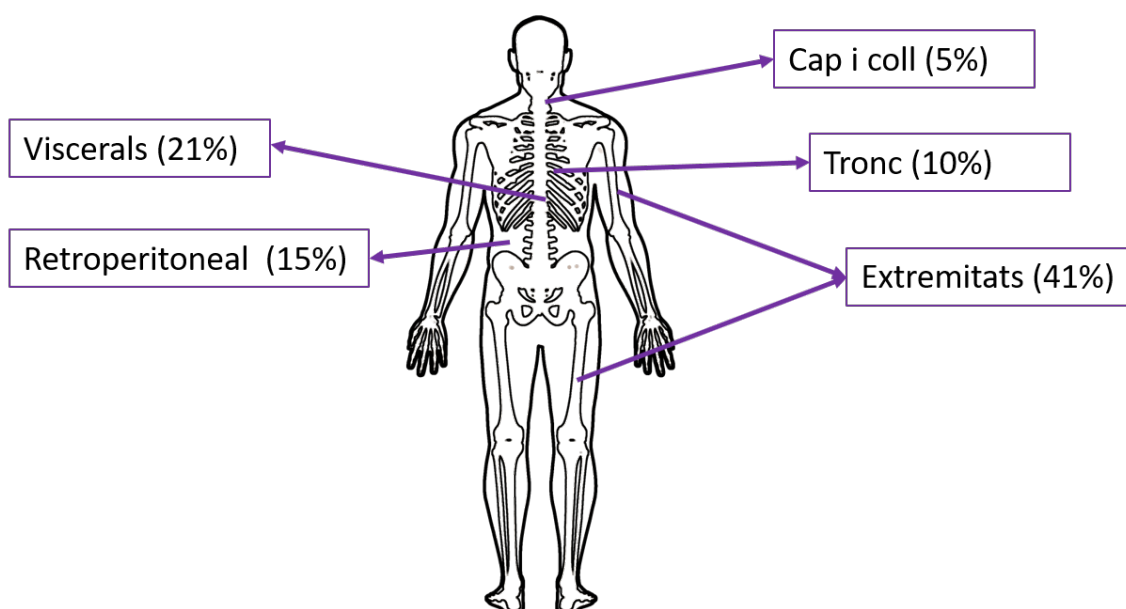


Figura 1. Localització sarcomes de parts toves. Modificat de (4)

Els subtipus histològics més freqüents són Sarcomes Pleomòrfics Indiferenciats, Liposarcomes, Leiomiosarcomes, Mixofibrosarcomes, Sarcomes Sinovials i Tumors Malignes de la Beina del Nervi Perifèric (1). Aquestes histologies representen un total del 65% dels sarcomes.

1.1.1. Classificació OMS

L'última classificació de l'OMS, publicada al 2020, divideix els tumors d'origen mesenquimal en grans famílies que alhora se subclassifiquen segons l'agressivitat i la capacitat de metastatitzar en tumors benignes, intermedis i malignes; i només aquests últims s'anomenen sarcomes (5).

Taula 1 . Classificació OMS

<u>TUMORS ADIPOCÍTICS</u>	
	Benignes: lipomes, angioliomes, mioliomes...
	Intermedis (localment agressius): tumor lipomatos atípic
	Malignes
	Liposarcoma ben diferenciat
	Liposarcoma desdiferenciat
	Liposarcoma mixoide
	Liposarcoma pleomòrfic
	Liposarcoma mixoide pleomòrfic
<u>TUMORS FIBROBLÀSTICS/MIOFIBROBLÀSTICS</u>	
	Benignes: fascitis nodular, miositis ossificant, elastofibroma...
	Localment agressius: fibromatosis desmoide, dermatofibroma protuberans...
	Rarament metastatitzants: tumor fibrós solitari, tumor miofibroblàstic inflamatori...
	Malignes
	Tumor fibrós solitari maligne
	Fibrosarcoma
	Mixofibrosarcoma
	Sarcoma fibromixoide de baix grau
	Fibrosarcoma esclerosant epitelioid
<u>TUMORS FIBROHISTOCÍTICS</u>	
	Benignes: tumor de cèl·lules gegants tenosinovial...
	Rarament metastatitzants: tumor fibrohistocític plexiforme, tumor de cèl·lules gegants
	Malignes: Tumor de cèl·lules gegants tenosinovial maligne
<u>TUMORS VASCULARS</u>	
	Benignes: hemangiomes
	Localment agressius: hemangioendoteliomes, sarcoma de Kaposi
	Malignes
	Hemangioendotelioma epitelioid
	Angiosarcoma
<u>TUMORS PERIVASCULARS</u>	
	Benignes: glomus, miofibrona, angioleiomioma

	Malignes: glomus maligne
<u>TUMORS DE MÚSCUL LLIS</u>	
	Benigne: leiomioma
	Intermedi: t.múscul llis associat a EBV...
	Malignes: leiomiosarcoma
<u>TUMORS DE MÚSCUL ESQUELÈTIC</u>	
	Benigne: rabdomioma
	Malignes
	Rabdomiosarcoma embrionari
	Rabdomiosarcoma alveolar
	Rabdomiosarcoma pleomòrfic
	Rabdomiosarcoma fusocel·lular/esclerosant
	Ectomesenquimioma
<u>TUMORS DE L'ESTROMA GASTROINTESTINAL</u>	
	Benigne: microGIST
	Maligne: GIST
<u>TUMORS CONDRALS</u>	
	Benigne: Condroma
	Maligne: Condrosarcoma
<u>TUMORS DE LA BEINA DEL NERVI PERIFÈRIC</u>	
	Benignes: schwannoma, neurofibroma, meningioma...
	Malignes
	Tumor maligne de la beina del nervi perifèric
	Tumor maligne melanocític de la beina del nervi perifèric
	Tumor maligne de cèl·lules granulars
	Perineurinoma maligne
<u>TUMORS DE DIFERENCIACIÓ INCERTA</u>	
	Benignes: mixoma, angiomixoma, angiomiolipoma
	Localment agressius: angiomiolipoma epitelioides
	Rarament metastatitzants: tumor ossificant fibromixoides, mioepitelioma...
	Malignes
	Tumor mesenquimal fofatúric maligne
	Neoplàsia fusocel·lular amb NTRK reordenat
	Sarcoma sinovial
	Sarcoma epitelioides
	Sarcoma alveolar de parts toves
	Sarcoma de cèl·lules clares
	Condrosarcoma mixoides extraesquelètic
	Tumor de cèl·lules petites i rodones desmoplàsic
	Tumor rabdoide
	Tumor epitelioides perivascular
	Sarcoma de la íntima
	Tumor fibromixoides ossificant maligne

	Carcinoma mioepitelial
	Sarcoma indiferenciat
	Sarcoma fusocel·lular indiferenciat
	Sarcoma pleomòrfic indiferenciat
	Sarcoma de cèl·lules rodones indiferenciat
TUMORS DE CÈL·LULES PETITES I RODONES INDIFERENCIATS D'ÓS I PARTS TOVES	
	Sarcoma d'Ewing
	Sarcoma de cèl·lules rodones amb fusions EWSR
	Sarcoma amb reordenament CIC
	Sarcoma amb alteració genètica BCOR

1.1.2. Classificació genòmica

La sarcomagènesi està dirigida per oncoproteïnes de fusió i/o mutacions i amplificacions que permeten l'activació d'oncogens i la pèrdua de funció de gens supressors tumorals, que comporten una proliferació cel·lular descontrolada, invasió i metàstasi.

Des d'un punt de vista genètic, els sarcomes es classifiquen entre els que tenen un cariotip simple (15-20%) i els que tenen un cariotip complex. Els sarcomes de cariotip simple estan definits per translocacions cromosòmiques que determinen proteïnes de fusió oncogèniques. Els sarcomes amb cariotips complexos s'associen a errors genètics o cromosòmics, com mutacions, guanys, pèrdues o amplificacions (6).

Taula 2. Sarcomes de cariotip simple (6)

Tipus de sarcoma	Translocació cromosòmica	Gen de fusió	Freqüència(%)
Sarcoma d'Ewing (EwS)	t(11;22)(q24;q12)	EWSR1-FLI1	85
	t(21;22)(q22;q12)	EWSR1-ERG	5–10
	t(7;22)(q24;q12)	EWSR1-ETV1	<1
	t(17;22)(q21;q12)	EWSR1-ETV4	<1
	t(2;22)(q33;q12)	EWSR1-FEV	<1
Sarcoma de cèl·lules clares	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1	>90
Liposarcoma mixoide (MLP)	t(12;16)(q13;p11)	FUS-CHOP	95
	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-CHOP	5
Condrosarcoma mixoide extraesquelètic	t(9;22)(q22;q12)	EWSR1-NR4A3	62
	t(9;17)(q22;q11)	TAF2N-NR4A3	27
	t(9;15)(q22;q21)	TCF12-NR4A3	4
Tumors desmoplàsics de cèl·lules petites i rodones (DSRCT)	t(11;22)(q13;q12)	EWSR1-WT1	≥86.3
Rabdomiosarcoma alveolar (ARMS)	t(2;13)(q35;q14)	PAX3- FKHR	55
	t(1;13)(q36;q14)	PAX7- FKHR	22
	t(2;2)(q35;p23)	PAX3-NCOA1	<10

	t(2;8)(q35;q13)	PAX3-NCOA2	<10
Sarcoma de parts toves alveolar	t(X;17)(p11;q25)	ASPSCR1-TFE3	100
Sarcoma sinovial	t(X;22)(p11.23;q11)	SS18-SSX1	>61
	t(X;18)(p11.21;q11)	SS18-SSX2	<37
	t(X;18)(p11;q11)	SS18-SSX4	Rar
Fibrosarcoma infantil	t(12;15)(q13;q25)	ETV6-NRTRK3	≥87.2

Taula 3. Sarcomes de cariotip complex (6)

Tipus de sarcoma	Alteracions genètiques	Gens afectats	Freqüència (%)
Leiomioma sarcoma (LMS)	Delecions	<i>PTEN</i>	57–69
		<i>RB1</i>	27–59
	Mutacions	<i>TP53</i>	33–49
		<i>ATRX</i>	17–26
		<i>MED12</i>	21
Osteosarcoma	Amplificacions	<i>MYOCD</i>	70
	Mutacions	<i>TP53</i>	47–82
		<i>RB1</i>	29–47
		<i>DLG2</i>	53
		<i>ATRX</i>	29
	Amplificacions	<i>c-Myc</i>	39–42
		<i>CCNE1</i>	33
		<i>RAD21</i>	38
		<i>VEGFA</i>	23
		<i>RUNX2</i>	Comú
Liposarcoma (no mixoide)	Amplificacions	<i>MDM2</i>	86–98
		<i>CDK4</i>	58–88
		<i>HMGA2</i>	75–93
		<i>c-JUN</i>	16–60
Condrosarcoma (no mixoide)	Mutacions	<i>IDH</i>	50–80
Fibrosarcoma (no infantil)	Amplificacions	<i>MDM2</i>	Comú
Rabdomiosarcoma embrionari (ERMS)	Delecions	<i>CDKN2A/B</i>	23
	Mutació activadora	<i>FGR4</i>	20
	Mutació activadora	<i>Ras family</i>	42
Angiosarcoma	Mutacions	<i>TP53, PTPRB</i>	66, 26
	Sobreexpressió	<i>VEGF</i>	80
Tumor maligne de la baina del nervi perifèric (MPNST)	Mutacions	<i>NF1</i>	87.5
		<i>CDKN2A</i>	75
		<i>TP53</i>	40.3
		<i>EED, SUZ12</i>	Comú
Sarcoma pleomòrfic indiferenciat (UPS)	Delecions	<i>RB1</i>	30–35

1.1.3. Diagnòstic

El diagnòstic dels sarcomes pot ser complex en moltes ocasions donada la baixa freqüència i l'heterogeneïtat d'aquests. Els pilars fonamentals del diagnòstic dels SPT són la radiologia i l'anatomia patològica, però les característiques clíniques dels pacients també ajuden a determinar el diagnòstic, ja que molts subtipus histològics són característics d'un determinat grup d'edat o sexe.

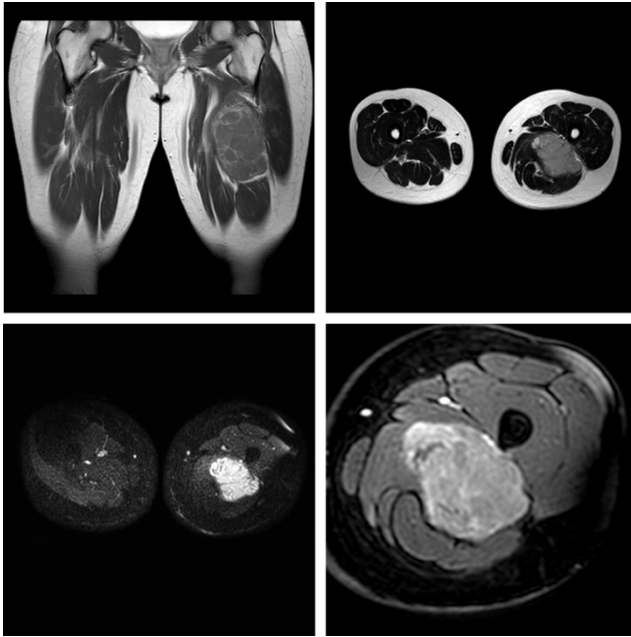
Des del punt de vista anatomopatològic, per a un correcte diagnòstic és imprescindible una biòpsia de bona qualitat mitjançant agulla gruixuda amb una sola via, tenint en compte que el punt d'entrada de l'agulla s'haurà d'incloure en la resecció per evitar la sembra tumoral (7).

Figura 2. Exemple biòpsia guiada per TC



La radiologia juga un paper fonamental en el diagnòstic inicial. La ressonància magnètica amb gadolini és la prova d'elecció per la majoria de lesions i localitzacions, però per tumoracions abdominals la TC amb contrast pot aportar major informació (8).

Figura 3. Exemple RMN basal pacient dona de 21 anys diagnosticada de sarcoma sinovial monofàsic grau 3 de cuixa esquerra.



L'estadificació segons l'última classificació de la UICC (Union for International Cancer Control) té en compte tant la mida del tumor primari com el grau histològic. Tots els pacients amb afectació adenopàtica es consideren estadi IV (9).

El grau histològic, descrit per la FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer) es determina a partir de la suma de 3 paràmetres: la diferenciació tumoral (1-3), l'activitat mitòtica (1-3) i la necrosi tumoral (0-2).

Taula 4. Classificació TNM (UICC)

T Tumor primari	
TX	Tumor primari no es pot avaluar
T0	Sense evidència de tumor primari
T1	Tumor de 5 cm o menys de diàmetre major
T2	Tumor de més de 5 cm i menor o igual de 10 cm de diàmetre major
T3	Tumor de més de 10 cm i menor o igual de 15 cm de diàmetre major
T4	Tumor de més de 15 cm de diàmetre major
N Ganglis limfàtics regionals	
N0	Sense metàstasis a ganglis limfàtics o desconegut
N1	Metàstasis a ganglis limfàtics regionals
M Metàstasis a distància	
M0	Sense metàstasis a distància
M1	Metàstasis a distància
G Grau – Grau histològic FNCLCC	
GX	Grau no avaluable
G1	Diferenciació tumoral, activitat mitòtica i necrosi tumoral – puntuació 2 o 3.
G2	Diferenciació tumoral, activitat mitòtica i necrosi tumoral – puntuació 4 o 5
G3	Diferenciació tumoral, activitat mitòtica i necrosi tumoral – puntuació 6, 7, o 8

Estadificació anatòmica AJCC/Grups pronòstics				
	T	N	M	G
Estadi IA	T1	N0	M0	G1, GX
Estadi IB	T1-T4	N0	M0	G1, GX
Estadi II	T1	N0	M0	G2, G3
Estadi IIIA	T2	N0	M0	G2, G3
Estadi IIIB	T3-T4	N0	M0	G2, G3
Estadi IV	Qualsevol T	N1	M0	Qualsevol G
	Qualsevol T	Qualsevol N	M1	Qualsevol G

L'elevada heterogeneïtat dels SPT i la seva baixa freqüència tant de manera global com a nivell individual de cadascun dels subtipus, així com el fet que puguin aparèixer en qualsevol localització i al llarg de totes les edats de la vida, entre altres característiques, fa que els

sarcomes siguin un conjunt de malalties d'alta complexitat. Per aquest motiu, és clarament necessària la implicació de diferents especialistes altament qualificats pel diagnòstic i el tractament dels sarcomes i, per tant, es recomana que tots els pacients amb sospita de sarcoma siguin derivats a centres de referència amb un equip multidisciplinari (8).

1.2. FACTORS PRONÒSTICS EN SARCOMES DE PARTS TOVES

Des d'un punt de vista clínic, donada l'heterogeneïtat d'aquests tumors, s'han intentat establir factors pronòstics que permetin detectar pacients amb major risc de recaiguda i/o mort, en els quals plantejar un tractament perioperatori (radioteràpia (RT) +/- quimioteràpia QT).

Als anys 90 es van establir com a factors pronòstics el grau (alt grau), la profunditat (tumors localitzats per sota de la fàscia) i la mida del tumor (>5cm) a partir de dos estudis del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) i la French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group (FNCLCC) (10,11). Així mateix, es va establir que certes histologies tenien un major risc de recaiguda local o de disseminació a distància.

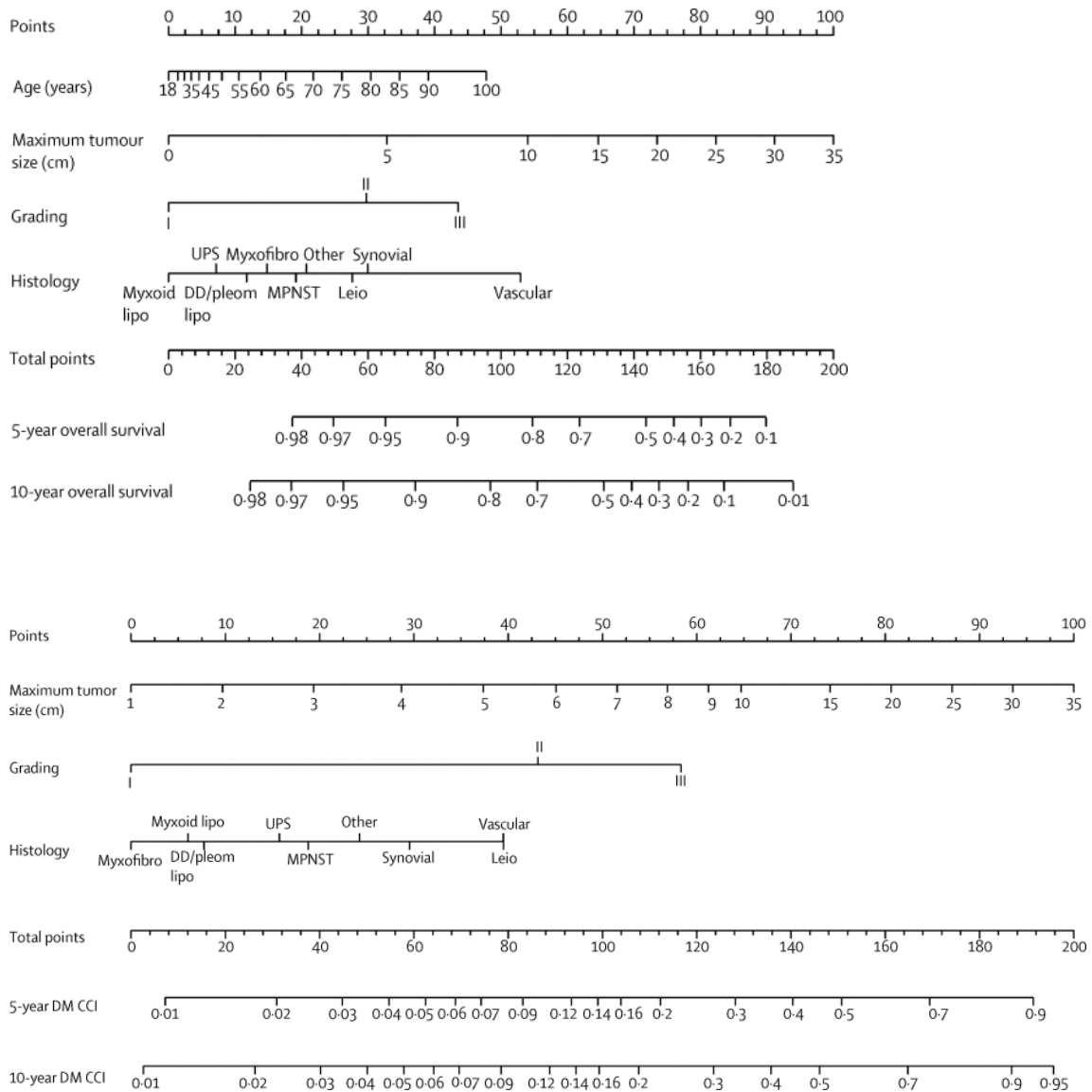
Utilitzant fonamentalment aquests factors (mida, grau, localització profunda) i afegint alguns altres com el subtipus histològic i l'edat, s'han generat diversos nomogrames que poden ajudar a predir el risc de recaiguda d'aquests pacients.

El grup de sarcomes del Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) va recopilar les dades de 2327 pacients tractats al seu centre entre el 1982 i el 2000, i utilitzant les variables clíniques edat, mida del tumor, grau histològic, subtipus histològic i localització va establir un nomograma de predicció de risc de mort associada al sarcoma als 12 anys (12).

Posteriorment, l'Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori (INT) de Milà (Itàlia) va validar aquest nomograma en 1013 pacients tractats al seu centre entre el 1980 i el 2000, i el van adaptar afegint el grau histològic segons la FNCLCC (13).

Més recentment, s'han desenvolupat 2 nous nomogrames (de SG i d'Incidència de Disseminació a Distància (DM CCI)) utilitzant una cohort de 1452 pacients tractats a l'INT de Milà i 3 cohorts de validació de pacients tractats a l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, França), el Mount Sinai (Toronto, Canada) i l'Hospital Royal Marsden (Londres, Regne Unit) (14). Amb aquests resultats es va desenvolupar una aplicació mòbil anomenada "Sarculator" per ajudar a la integració d'aquests nomogrames a la pràctica clínica.

Figura 4. Nomogrames de Supervivència Global i Disseminació a Distància (14)



No obstant això, aquests nomogrames no són útils com a biomarcadors predictius de resposta a tractament i no tenen en compte la sensibilitat dels sarcomes als diferents tractaments. En aquest sentit, s'han intentat identificar biomarcadors moleculars mitjançant la genòmica i la transcriptòmica amb resultats interessants, però que encara requereixen estudis clínics de validació prospectiva.

Mitjançant l'estudi genòmic d'una mostra de 187 sarcomes es va desenvolupar una signatura d'expressió gènica anomenada CINSARC (*Complexity Index in Sarcomas*) composta per 67 gens involucrats en el control de la mitosi i la integritat cromosòmica, que es va validar en una cohort de 127 sarcomes, amb un valor predictiu superior a les classificacions clàssiques de la FNCLCC (15). Aquesta signatura encara no s'ha aconseguit validar en estudis prospectius (16).

1.3. TRACTAMENT DE LA MALALTIA LOCALITZADA/ LOCORREGIONAL

1.3.1. Cirurgia

El tractament principal dels SPT localitzats és la cirurgia amb marges amplis (R0). Això pot comportar dificultats en moltes situacions donada la localització d'aquests tumors, motiu pel qual en casos seleccionats s'accepta una cirurgia amb marges R1 preplanificats. (8).

Figura 5. Exemple pacient home de 75 anys amb sarcoma pleomòrfic indiferenciat subcutani (foto cortesia de la Dra. Laura Trullols – Servei Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia HSCSP).



1.3.2. Radioteràpia

La radioteràpia, ja sigui en el context preoperatori o després de la cirurgia, ha demostrat un augment del control local del tumor amb disminució del risc de recaiguda, tot i que sense un impacte clar i demostrat en supervivència global (SG).

El primer estudi prospectiu aleatoritzat per valorar el benefici de la RT adjuvant es va publicar el 1998. Es van aleatoritzar 141 pacients amb sarcomes d'extremitats candidats a cirurgia conservadora (91 pacients amb sarcomes d'alt grau i 50 de baix grau) a rebre o no RT adjuvant. Els pacients amb sarcomes d'alt grau rebien QT adjuvant amb doxorubicina i ciclofosfamida concomitant amb RT. Es va observar un benefici en la disminució del risc de recaiguda local sense

diferències en SG (17). El seguiment a llarg termini va mostrar diferències numèriques no significatives en SG a 20 anys (71% vs 64% $p=0.22$) (18).

El 2002 es va publicar un estudi on es van aleatoritzar 190 pacients a realitzar RT neoadjuvant (dosi: 50 grays (Gy) en 25 sessions) o postoperatòria (66 Gy en 33 sessions), que va mostrar un benefici en SG a favor de la RT neoadjuvant ($p=0.048$), però també un augment de les complicacions de la cicatrització ($p=0.01$) (O'Sullivan B et al. 2002).

Posteriorment, es va publicar una metaanàlisi amb un total de 3958 pacients de 16 estudis (incloïa tant tumors primaris d'extremitat com retroperitoneals). Els resultats van demostrar un benefici en la reducció del risc de recaiguda local (OR 0.49, $p = 0.001$) a favor de la RT, però sense benefici en SG. En 11 d'aquests estudis es comparava la RT pre i postoperatòria amb benefici de la preoperatòria en recaiguda local (OR 0.67, $p = 0.01$), però amb un augment de les complicacions a la cicatrització (20).

En base a aquests dos estudis, totes les guies clíniques recomanen el tractament amb RT en tots els sarcomes d'alt grau localitzats a les extremitats (graus 2-3), sempre amb prèvia discussió al comitè multidisciplinari (8,21).

1.3.3. Quimioteràpia

El paper de la QT en malaltia localitzada sempre ha estat controvertit. S'han realitzat múltiples estudis amb tractaments i duracions diferents, principalment basats en antraciclins (doxorubicina o epirubicina) i ifosfamida.

El 1997 es va publicar la primera metaanàlisi on es van incloure un total de 1568 pacients de 14 estudis clínics d'adjuvència basada en doxorubicina amb diferents esquemes i duracions de tractament. Es van veure diferències estadísticament significatives en termes d'interval lliure de recaiguda local (HR 0.73; 95% CI 0.56–0.94, $p=0.016$) i interval lliure de recaiguda a distància (HR 0.70 (0.57–0.85, $p=0.0003$), però no en termes de SG (HR 0.89 (0.76–1.03; $p=0.12$), tot i que es van observar diferències numèriques d'un 4% (del 50 al 54% a 10 anys). En l'estudi de subgrups, en els pacients amb SPT d'extremitats es va veure un benefici de la quimioteràpia amb un HR 0.8 ($p=0.029$) equivalent amb un 7% de benefici absolut a 10 anys (22).

Posteriorment, Frustaci *et al.* (23) van publicar al 2001 els resultats d'un estudi aleatoritzat realitzat pel grup cooperatiu italià (*Italian Sarcoma Group*, ISG). L'estudi va analitzar l'ús de QT adjuvant en SPT d'extremitats d'alt risc (≥ 5 cm, alt grau) amb epirubicina (60 mg/m² dies 1 i 2) i ifosfamida (1.8g/m² dies 1-5) cada 21 dies per 5 cicles, i va demostrar benefici significatiu en

supervivència lliure de progressió (SLP; 48 mesos vs 16 mesos; $p=0.04$) i SG (75 mesos vs 46 mesos; $p=0.03$).

Una segona metaanàlisi publicada per Pervaiz *et al.* (24) al 2008 va afegir 4 nous estudis als 14 inclosos a la metaanàlisi del 1997 i va analitzar un total de 1953 pacients. Els resultats van ser similars als de la metaanàlisi prèvia en termes de recurrència local i a distància. En SG, l'adjuvència amb doxorubicina en monoteràpia no va obtenir benefici estadísticament significatiu (OR 0.84; 95% CI, 0.68-1.03; $p = 0.09$), però l'odds ratio (OR) per adjuvència amb doxorubicina combinada amb ifosfamida va ser de 0.56 (95% CI, 0.36-0.85; $p = 0.01$).

Una dècada després, al 2012, es va publicar un estudi de l'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), en el qual es van incloure 351 pacients operats amb SPT de grau intermedi o alt aleatoritzats a controls o adjuvència amb doxorubicina 75mg/m² i ifosfamida 5g/m² per 5 cicles. Els resultats no van mostrar benefici significatiu ni en SG ni en supervivència lliure de recaiguda (SLR) (25). Més recentment, es va aplicar el nomograma *Sarculator* per estratificar el pronòstic dels pacients inclosos en aquest estudi i es va observar un benefici significatiu de la supervivència lliure de malaltia (SLM) a 8 anys (33.5% vs 12.5%) i la SG a 8 anys (42.1% vs 20.8%) en els grups de pacients de mal pronòstic (*lower projected 10-year OS <60%*) (26).

L'ISG conjuntament amb el *Grupo Español de Investigación en Sarcomas* (GEIS) van dissenyar un estudi de no-inferioritat comparant 3 cicles de QT neoadjuvant amb epirubicina (60 mg/m² dies 1 i 2) i ifosfamida (3000mg/m² dies 1, 2, i 3) amb la mateixa pauta més 2 cicles d'adjuvència. L'estudi va demostrar la no-inferioritat de 3 cicles de tractament respecte a 5 cicles (27). Amb aquests resultats, es va intentar anar més enllà en el tractament neoadjuvant administrant QT més específica segons el subtipus tumoral. Es va dissenyar un estudi prospectiu en el qual els pacients s'aleatoritzaven segons la seva histologia a tractament neoadjuvant amb QT estàndard (epirubicina + ifosfamida 3 cicles) o tractament dirigit per histologia. Es van aleatoritzar 287 pacients a rebre tractament amb epirubicina més ifosfamida o tractament dirigit, i es va observar un benefici significatiu de la branca control en termes de supervivència lliure de metàstasis i SG: supervivència lliure de metàstasis a 5 anys del 54.6% i SG a 5 anys del 75.7%. A partir dels resultats d'aquest estudi, diferents grups europeus van introduir el tractament neoadjuvant en els seus protocols per pacients diagnosticats de SPT d'alt risc (28,29). A les guies de la *European Society for Medical Oncology* (ESMO) (8) es recomana amb un nivell d'evidència II B proposar als pacients amb alt risc de mort un tractament adjuvant o neoadjuvant amb un mínim de 3 cicles.

Les guies *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (30) proposen RT +/- QT amb antraciclins (doxorubicina o epirubicina) i ifosfamida pre o postoperatoria en estadis III i IV ganglionars.

1.4. OBJECTIUS DEL TRACTAMENT NEOADJUVANT

L'administració del tractament perioperatori abans de la cirurgia té els següents objectius principals (31):

- El tractament precoç de la malaltia micrometastàsica.
- La reducció de la mida tumoral per permetre una resecció completa i així reduir el risc de recaiguda local.
- Evitar que possibles complicacions postquirúrgiques puguin impedir la quimioteràpia posterior (p.ex: dehiscències o infeccions).
- Valorar la quimiosensibilitat del tractament administrat.

Entre els desavantatges a la QT neoadjuvant cal destacar que, donada la manca de factors predictius de resposta, existeixen sarcomes resistents de manera intrínseca a la QT (p.ex el sarcoma alveolar de parts toves). En aquests casos, la quimioteràpia no estaria recomanada ja que només aporta al pacient toxicitat i un possible endarreriment de la cirurgia, que és el tractament definitiu.

Per tant, la quimioteràpia perioperatoria només estaria indicada en tumors sensibles al tractament, així com aquells que compleixen criteris d'alt risc de recaiguda. No obstant això, tal com s'ha comentat prèviament, tot i seguir aquests criteris clínics de selecció dels pacients, hi ha una manca de biomarcadors per ajudar-nos a seleccionar quins pacients es poden beneficiar més del tractament quimioteràpic neoadjuvant.

Per aquest motiu, es planteja imprescindible la recerca de possibles biomarcadors predictius de resposta als tractaments quimioteràpics.

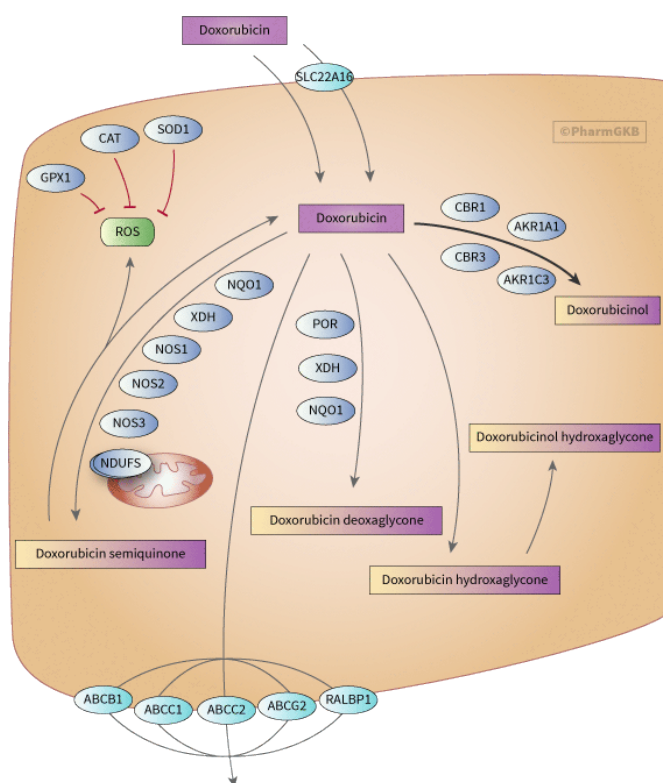
1.5. QUIMIOTERÀPIA AMB ANTRACICLINES – IFOSFAMIDA. El paper de la farmacogenètica en la identificació de biomarcadors predictius de resposta al tractament

1.5.1. Antraciclins: doxorubicina i epirubicina

Les antraciclins són fàrmacs extrets a partir del bacteri *Streptomyces peucetius*, variant *caesius*. Actuen sobre la topoisomerasa 2 provocant ruptures de la doble cadena d'ADN que porta a la mort cel·lular, a més de catalitzar reaccions d'oxidació-reducció que generen radicals lliures que promouen els efectes antitumorals, però també la toxicitat. Les toxicitats més destacades de les antraciclins són les citopènies, la toxicitat cardíaca i la mucositis. La doxorubicina és l'antraciclina més coneguda i s'utilitza des dels anys 70 pel tractament de diverses neoplàsies sòlides i hematològiques, entre elles els sarcomes. L'epirubicina és un isòmer de la doxorubicina, amb un perfil de toxicitat més favorable, motiu pel qual en els últims anys ha anat substituint la doxorubicina en els diferents esquemes de tractament (32).

Les antraciclins són molècules hidròfobes que entren a la cèl·lula per difusió passiva o mitjançant el transportador SLC22A16. Un cop a la cèl·lula, existeixen tres vies metabòliques principals. La primera i més important és la reducció de dos electrons de doxorubicina a doxorubicinol; aquesta reacció es catalitza per diferents enzims: l'enzim carbonil reductasa 1 (CBR1), localitzat principalment al fetge; aldo-keto reductasa 1A1 (AKR1A), predominantment al teixit cardíac; carbonil reductasa 3 (CBR3) i aldo-keto reductasa 1C3 (AKR1C3). La segona via és la de reducció d'un electró, catalitzada per diferents oxidoreductases per formar doxorubicina semiquinona com són NADH deshidrogenases, NADPH deshidrogenases (NQO1), xantin oxidasa (XDH) i sintases d'òxid nítric (NOS). La reoxidació de doxorubicina semiquinona pot crear espècies d'oxigen reactiu (ROS), causant estrès oxidatiu, que es considera responsable de la cardiotoxicitat. La tercera via, la més minoritària, és la deglicosilació, que es creu que està mediada per NADPH. Diferents transportadors com són ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, RALBP1 participen en la sortida de doxorubicina de la cèl·lula i s'han descrit diferents mecanismes de resistència per aquesta via (33–39).

Figura 6. Metabolisme de la doxorubicina (33)

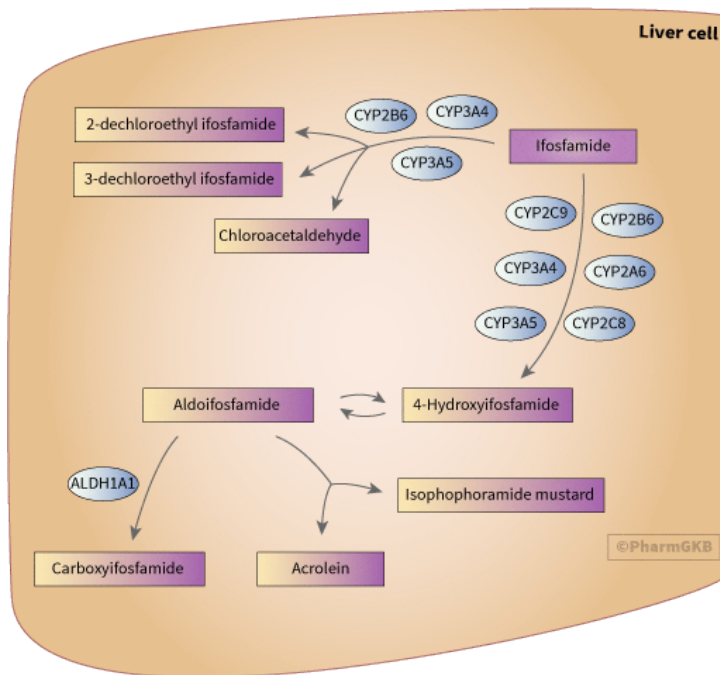


1.5.2. Ifosfamida

La ifosfamida és un agent alquilant anàleg de la ciclofosfamida, que actua formant enllaços creuats ADN-ADN que provoquen la inhibició de la síntesi d'ADN i la mort cel·lular. Les toxicitats més freqüents degudes al fàrmac són, a part de l'hematològica, la cistitis hemorràgica i la neurotoxicitat. Per evitar la toxicitat vesical, la ifosfamida a dosis altes s'administra conjuntament amb mesna o l'N-acetil cisteïna, que actuen com a citoprotectors.

La ifosfamida es metabolitza al fetge; s'activa a 4-hidroxifosfamida pel citocrom p450, especialment les isoformes CYP3A4 i CYP2D6, i aquesta es converteix en aldoifosfamida. Es creu que aquests metabòlits actius difonen de manera passiva cap al torrent sanguini i entren en altres cèl·lules. L'aldoifosfamida té dues vies d'eliminació, una mediada per ALDH1A1 que la detoxifica a carboxifosfamida, i una segona que consisteix en una reacció espontània no enzimàtica que produeix el metabòlit actiu mostassa isofosforamida i l'acroleïna, associada a la toxicitat vesical (40).

Figura 7. Metabolisme de la ifosfamida (40)

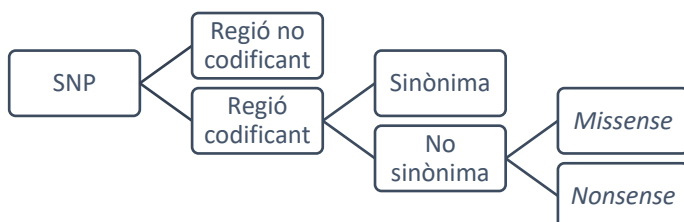


1.5.3. Farmacogenètica de la quimioteràpia neoadjuvant en els SPT

El tractament amb antraciclins i ifosfamida ha demostrat benefici en la disminució del risc de recaiguda i mort en pacients d'alt risc (veure punt 1.2), però aquests tractaments tenen una toxicitat associada important, especialment hematològica (41), i encara no disposem de biomarcadors validats que ajudin a predir quins pacients es beneficiaran del tractament sistèmic. En aquest sentit, les diferències genètiques interindividuals podrien ser una de les claus per ajudar-nos a valorar el risc-benefici d'aquests tractaments en el moment de la prescripció i contribuir a una medicina de precisió.

Les variacions en el genoma poden ser canvis en un sol nucleòtid de la seqüència d'ADN (polimorfismes d'un sol nucleòtid o SNP per les seves sigles en anglès "single nucleotide polymorphisms"), insercions (IN), delecions (DEL) o variacions en el nombre de còpies de gens (CNV). En concret, els polimorfismes són variants presents almenys en l'1% de la població. Aquests polimorfismes es poden donar en regions codificants de l'ADN i ocasionar canvis en els aminoàcids o en regions no-codificants i ocasionar canvis en els processos de transcripció i/o traducció.

Figura 8. Classificació dels polimorfismes de nucleòtid únic (SNP)



A partir dels polimorfismes d'un mateix gen es poden construir haplotips. Un haplotip és una combinació d'un al·lel d'un locus amb un al·lel d'un locus diferent (en general pròxims en el cromosoma), en què la recombinació genètica és molt baixa o nul·la. La utilització d'haplotips en estudis d'associació pot augmentar el poder estadístic respecte als estudis d'al·lel únic.

La farmacogenètica i farmacogenòmica són disciplines que estudien l'impacte que poden tenir aquestes variants genètiques sobre la toxicitat o la resposta als fàrmacs (42). Polimorfismes en els gens que codifiquen per les proteïnes implicades en el metabolisme d'antraciclina i ifosfamida poden influir en l'efecte clínic i la toxicitat d'aquests fàrmacs. S'han publicat diversos estudis farmacogenètics, especialment en pacients amb càncer de mama per ser un dels tumors més freqüents, i tot i que els resultats que s'han després d'aquests estudis no han estat concloents (38,43–47), permeten proposar els esmentats polimorfismes com a candidats a ser biomarcadors en SPT.

En relació amb les antraciclina, s'han descrit diversos polimorfismes en gens que participen en el seu metabolisme. Alguns dels més estudiats són:

- El gen *ABCB1* codifica per a la glicoproteïna P, que és un transportador de múltiples fàrmacs. S'ha postulat que aquesta proteïna està implicada en la resistència a la doxorubicina i en la disposició de diversos fàrmacs (33,35). Tres polimorfismes a *ABCB1* (rs1045642, rs2032582 i rs1128503) tenen freqüències molt similars i s'acostumen a estudiar com a haplotip (36). Aquests polimorfismes s'han associat amb la toxicitat i la resposta a molts fàrmacs, entre ells les antraciclina, en diferents tipus de tumors, com en el càncer de mama o l'osteosarcoma (45,48,49)
- El gen *ABCC2* codifica per un altre transportador implicat en la disposició de la doxorubicina, també anomenat MRP1. S'ha vist que diferents polimorfismes en aquest gen (com per exemple rs3740066, rs2273697) poden ser biomarcadors de toxicitats

hematològiques i gastrointestinals en pacients amb càncer de mama tractats amb un esquema basat en doxorubicina (43).

- El gen *NQO1* codifica per un enzim implicat en la protecció contra l'estrès oxidatiu i la carcinogènesi, incloent l'estabilització del gen supressor tumoral *TP53*. El polimorfisme rs1800566 comporta una menor activitat d'aquest enzim i podria implicar un augment de la toxicitat a antraciclins i possiblement una pitjor supervivència dels pacients (38,46,50,51).
- El gen *CBR3* codifica per una carbonil reductasa implicada en la catàlisi de doxorubicina a doxorubicinol *in vivo*. Variants genètiques en aquests gens poden contribuir a la variabilitat farmacocinètica i farmacodinàmica de la doxorubicina i, per tant, a la toxicitat (39).
- El gen *SLC22A16* codifica per un transportador de cations orgànics, mediador de la captació de doxorubicina a les cèl·lules canceroses. Polimorfismes en aquest gen s'han relacionat amb la toxicitat (45).

En relació amb la ifosfamida, la majoria d'estudis farmacogenètics realitzats se centren en el gen *ALDH1A1*. L'aldehid deshidrogenasa 1A1 (*ALDH1A1*) intervé en la detoxificació de l'aldoifosfamida a carboxifosfamida, i se sap que modificacions en la seva activitat enzimàtica estan relacionades amb la toxicitat i la resistència tumors (40).

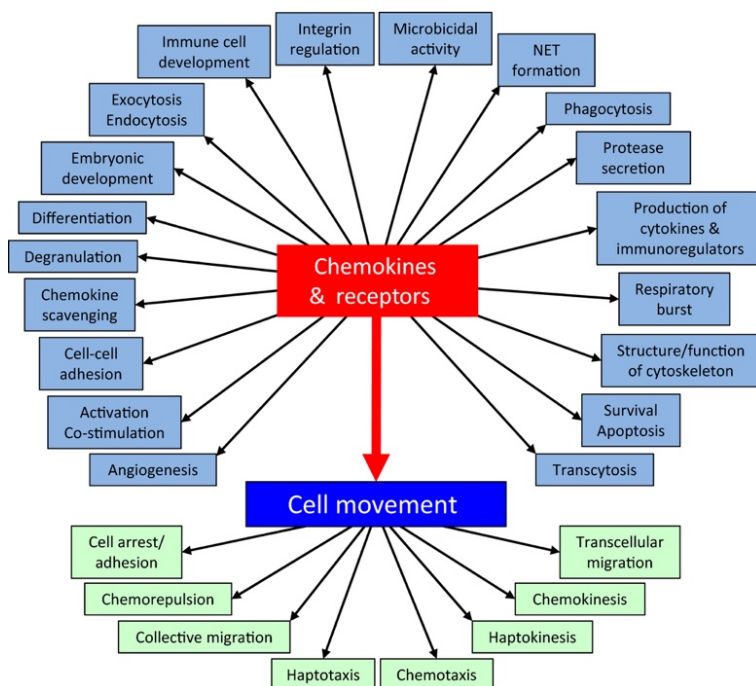
1.6. NOUS FACTORS PRONÒSTICS EN ELS SPT. LES CITOQUINES COM A BIOMARCADORS EN SARCOMES

Com ja s'ha descrit anteriorment, el grau, la profunditat i la mida del tumor (>5cm) són els factors pronòstics que s'utilitzen actualment en la pràctica clínica per decidir a quins pacients proposar tractament neoadjuvant o adjuvant. No obstant això, aquests són clarament insuficients donat que els pacients amb SPT d'alt risc tenen, malgrat els tractaments administrats, una taxa elevada de recaigudes a distància. Per tant, impera la necessitat d'identificar nous factors pronòstics en pacients candidats a QT neoadjuvant.

En la recerca de nous factors de pronòstic, cal centrar-se en aquelles molècules que estan implicades en processos fisiològics i patològics, ja que representen noves vies no només per a la intervenció terapèutica, sinó també per la guia terapèutica. En aquest context, les quimiocines són un subtipus de citocines anomenades quimiotàctiques, conegudes per la seva capacitat d'estimular la migració cel·lular, principalment els leucòcits.

Les funcions de les quimiocines i els seus receptors es detallen en la imatge següent (52). Segons les seves funcions, les quimiocines es poden classificar en dues categories: les citoquines inflammatòries, induïdes pel sistema immune en resposta a infeccions i dany, i les citoquines homeostàtiques, que son constitutives (53)

Figura 9. Funcions de les quimiocines i els seus receptors (52)



És d'especial rellevància CXCR4 degut a que està sobreexpressat en molts tipus de càncers, com ara ronyó, pulmó, cervell, pròstata, mama, pàncrees, ovari i melanomes i contribueix al creixement tumoral, als processos d'angiogènesi, metàstasi i resistència terapèutica (54). La quimiocina CXCL12, també coneguda com a *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1), s'uneix al receptor CXCR4. CXCL12 és un factor derivat de les cèl·lules estromals que indueix la migració de cèl·lules mare hematopoietiques, cèl·lules endotelials i leucòcits i participa en la embriogènesi, la hematopoiesi, l'angiogènesi i en fenòmens inflamatoris (52,55). La unió de CXCL12 amb CXCR4 indueix l'activació d'una cascada de senyalització essencial per la vascularització, la regeneració tissular, la invasió cel·lular tumoral i la proliferació, jugant un paper clau en l'angiogènesi tumoral, la progressió i la metàstasi (56).

En aquest sentit, diferents estudis han relacionat l'expressió de CXCR4 amb pitjor pronòstic en diferents tipus de tumors (57–60). En sarcomes s'han publicat diferents estudis, entre els quals hi ha una metaanàlisi que incloïa pacients de 12 estudis amb 997 pacients (sarcomes ossis i parts toves). L'expressió de CXCR4 (per IHQ o RT-PCR) s'ha associat de forma estadísticament

significativa amb una pitjor SG (HR 2.37, 95% CI 1.86-3.01), $p < 0.001$) en el global de pacients i amb un augment del risc de metàstasi (OR 6.97, 95% CI 2.28-21.31) (61).

En els últims anys, la via de senyalització CXCR4/CXCL12 també s'ha convertit en una línia d'investigació terapèutica i s'estan desenvolupant antagonistes i anticossos dirigits contra CXCR4 (53,56). Des del 2012, el Grup de Recerca d'Oncogènesi i Antitumorals de l'Institut de Recerca Sant Pau, amb qui col·laborem estretament, està desenvolupant una nanopartícula dirigida contra CXCR4 en diferents tumors que expressen CXCR4 amb resultats encoratjadors (62–65).

2. HIPÒTESIS

La identificació de nous biomarcadors pronòstics i predictius de toxicitat i resposta en sarcomes de parts toves pot ajudar a seleccionar els pacients amb un major benefici de tractament neoadjuvant o adjuvant que impacti en la seva supervivència.

- Polimorfismes en gens involucrats en el metabolisme de les antraciclines i la ifosfamida poden ser biomarcadors pronòstics o predictius de toxicitat, resposta a tractament i supervivència en sarcomes de parts toves tractats amb quimioteràpia neoadjuvant.
- L'expressió de CXCR4 per immunohistoquímica pot ser un biomarcador pronòstic en sarcomes de parts toves localitzats.

3. OBJECTIUS

3.1. OBJECTIU PRINCIPAL

- Identificar possibles biomarcadors pronòstics o predictius de resposta a quimioteràpia neoadjuvant en pacients amb sarcomes de parts toves d'extremitats localitzats tractats a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

3.2. OBJECTIUS SECUNDARIS

- Identificar variants genètiques en pacients diagnosticats de sarcomes de parts toves localitzats tractats amb quimioteràpia neoadjuvant basada en antraciclins i/o ifosfamida per valorar el seu ús com a biomarcadors farmacogenètics de toxicitat i/o eficàcia.
- Analitzar l'expressió per immunohistoquímica de CXCR4 en mostres tumorals de pacients diagnosticats de sarcomes de parts toves d'extremitats localitzats, en 3 moments de la malaltia (en el diagnòstic, en la cirurgia després de neoadjuvència i en la recaiguda), per tal de valorar el seu ús com a biomarcador pronòstic.
- Generar hipòtesis per futurs estudis de biomarcadors pronòstics i predictius en els diferents subtipus de sarcomes.

4. COMPENDI DE PUBLICACIONS

4.1. Article 1

Virgili Manrique AC, Salazar J, Arranz MJ, Bagué S, Orellana R, López-Pousa A, Cerdà P, Gracia I, Majercakova K, Peiró A, Trullols L, Fernández M, Valverde S, Quintana MJ, Bell O, Artigas-Baleri A, Sebio A. Pharmacogenetic Profiling in High-Risk Soft Tissue Sarcomas Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *J Pers Med*. 2022 Apr 11;12(4):618. doi: 10.3390/jpm12040618. PMID: 35455734; PMCID: PMC9024670.

Article

Pharmacogenetic Profiling in High-Risk Soft Tissue Sarcomas Treated with Neoadjuvant Chemotherapy

Anna C. Virgili Manrique ^{1,2} , Juliana Salazar ^{3,*} , María Jesús Arranz ⁴ , Silvia Bagué ⁵ , Ruth Orellana ⁵ , Antonio López-Pousa ¹, Paula Cerdà ¹, Isidre Gracia ⁶, Katarina Majercakova ⁷, Ana Peiró ⁶, Laura Trullols ⁶, Manuel Fernández ⁸, Sandra Valverde ⁹, María Jesús Quintana ¹⁰ , Olga Bell ³, Alicia Artigas-Baleri ¹¹ and Ana Sebío ^{1,*}

- ¹ Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; avirgili@santpau.cat (A.C.V.M.); alopezp@santpau.cat (A.L.-P.); pcerda@santpau.cat (P.C.)
- ² Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain
- ³ Medical Translational Oncology Laboratory, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; obell@santpau.cat
- ⁴ Fundació Docència i Recerca Mútua Terrassa, 08221 Terrassa, Spain; mjarranzc@gmail.com
- ⁵ Department of Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; sbaguer@santpau.cat (S.B.); rorellana@santpau.cat (R.O.)
- ⁶ Orthopaedics and Trauma Surgery, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; igracia@santpau.cat (I.G.); apeiro@santpau.cat (A.P.); ltrullols@santpau.cat (L.T.)
- ⁷ Radiation Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; kmajercakova@santpau.cat
- ⁸ Plastic and Reconstructive Surgery, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; mfernandezga@santpau.cat
- ⁹ Radiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; svalverde@santpau.cat
- ¹⁰ Epidemiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; mjquintana@santpau.cat
- ¹¹ Genetics Department, IIB-Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; aartigas@santpau.cat
- * Correspondence: jsalazar@santpau.cat (J.S.); asebio@santpau.cat (A.S.)



Citation: Virgili Manrique, A.C.; Salazar, J.; Arranz, M.J.; Bagué, S.; Orellana, R.; López-Pousa, A.; Cerdà, P.; Gracia, I.; Majercakova, K.; Peiró, A.; et al. Pharmacogenetic Profiling in High-Risk Soft Tissue Sarcomas Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 618. <https://doi.org/10.3390/jpm12040618>

Academic Editor: Amelia Filippelli

Received: 14 March 2022

Accepted: 7 April 2022

Published: 11 April 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/>).

Abstract: Neoadjuvant chemotherapy based on anthracyclines and ifosfamide for high-risk soft tissue sarcomas (STS) of the extremities and trunk is a controversial treatment option. There are substantial interindividual differences in clinical outcomes in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. The aim of this study was to evaluate, as biomarkers, polymorphisms in genes encoding drug-metabolizing enzymes, drug transporters, or drug targets and their association with toxicity and survival in STS patients treated with neoadjuvant chemotherapy. We analysed variants in genes involved in anthracycline metabolism (*ABCB1*, *ABCC2*, *NQO1*, *CBR3*, and *SLC22A16*) and in ifosfamide catabolism (*ALDH1A1*) in 79 treated patients. Two genes showed significant association after adjusted multivariate analysis: *ABCC2* and *ALDH1A1*. In patients treated with anthracyclines, *ABCC2* rs3740066 was associated with risk of febrile neutropenia ($p = 0.031$), and with decreased overall survival (OS) ($p = 0.024$). *ABCC2* rs2273697 was associated with recurrence-free survival (RFS) ($p = 0.024$). In patients treated with ifosfamide, *ALDH1A1* rs3764435 was associated with RFS ($p = 0.046$). Our pharmacogenetic study shows for the first time that variants in genes regulating the metabolism of neoadjuvant chemotherapy may be helpful to predict toxicity and survival benefit in high-risk STS treated with neoadjuvant chemotherapy. Further validation studies are needed to establish their clinical utility.

Keywords: soft tissue sarcoma; neoadjuvant; pharmacogenetics; anthracyclines; ifosfamide; *ALDH1A1*; *ABCC2*; *ABCB1*

1. Introduction

Soft tissue sarcomas (STS) are a group of rare diseases that include more than 80 different subtypes [1]. Wide local excision is the gold-standard treatment. Nonetheless,

approximately 50–60% of patients diagnosed with the high-risk localised disease will develop distant metastases despite appropriate surgery, and long-term survival is poor. Perioperative chemotherapy and/or radiotherapy may improve the long-term prognosis and is an option, although controversial, for patients with STS of the extremities and trunk who are considered to be at a high risk of relapse [2]. Perioperative chemotherapy consists of a combination of anthracyclines and ifosfamide. Administration in the pre-operative setting has several advantages over adjuvant treatments, such as the possibility of tumour downstaging, allowing limb-sparing surgery, early treatment of micrometastatic disease, and evaluation of tumour chemosensitivity [3]. Despite the known benefits of chemotherapy, there are huge interindividual differences in terms of toxicity and outcome. These interindividual differences are independent of patient characteristics and histology and might compromise adherence to treatment and, potentially, treatment benefit and survival. Common clinical factors used for decision making when considering neoadjuvant chemotherapy in high-risk patients include histology, age and performance status, but new biomarkers are needed to personalize treatments and reduce side effects that could jeopardize the patient's prognosis.

The antitumour activity and toxicity of doxorubicin and its 4'-epi-isomer epirubicin may be conditioned by alterations in their transporters or in the enzymes related to the generation of free-radicals that provoke DNA and cell membrane damage [4,5]. These transporters include the ATP-binding cassette (ABC) proteins ABCB1 (P-gp, MDR1) and ABCC2 (MRP2), which are efflux transporters involving doxorubicin disposition [4,6,7], and the solute carrier SLC22A16, an organic cation influx transporter that mediates doxorubicin uptake in cancer cells [8]. Enzymes involved in doxorubicin metabolism include NAD(P)H quinone oxidoreductase I (NQO1), which is implicated in processes that protect against oxidative stress and carcinogenesis, such as stabilization of the p53 tumour suppressor [9], and the carbonyl reductases (CBRs) CBR3 and CBR1, which catalyse the reduction of doxorubicin to doxorubicinol in vivo [10].

Ifosfamide is a DNA alkylating agent that is transformed into several metabolites, some being therapeutically active and others toxic. In this process, aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) mediates the detoxification of aldoifosfamide to carboxyifosfamide, and modifications in this enzyme activity are known to be related to toxicity and tumour resistance [11].

Polymorphisms of genes coding for these proteins may influence the pharmacokinetic and pharmacodynamic variability of anthracycline or ifosfamide therapies, and, therefore, contribute to toxicity and treatment resistance and eventually compromise survival [12]. Several studies, mostly performed in breast cancer, have tried to correlate single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes with toxicity or outcome, with inconclusive results [9,13–17]. Moreover, information about pharmacogenetics in sarcomas is scarce, and to our knowledge, no studies have been performed to date in the context of high-risk localised STS. The aim of this study was to analyse the relationship between germline polymorphisms in genes involved in the metabolism of anthracyclines or ifosfamide and toxicity, pathological response and survival in high-risk localised STS treated with neoadjuvant chemotherapy.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

We included 95 patients diagnosed with extremity or trunk STS treated with neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau from January 2006 to March 2021. Patients received different regimens of chemotherapy according to local practice or clinical trials. The majority of patients received epirubicin 60 mg/m² per day (days 1, 2) plus ifosfamide 3 g/m² per day (days 1, 2, 3), repeated every 21 days for 3 cycles (64.2% of patients), or high dose ifosfamide 12 g/m² (25.2% of patients) (Table 1). The use of neoadjuvant or adjuvant radiotherapy was discussed individually in the multidisciplinary tumour board.

Table 1. Demographic and clinicopathological characteristics of high-risk soft tissue sarcoma patients ($n = 95$).

Patient and Tumour Characteristics ($n = 95$)	n	%
Age (years)		
Median	53	
Range	19–77	
<60	68	71.6
≥60	27	28.4
Sex		
Male	59	62.1
Female	36	37.9
ECOG * performance status		
0	34	35.8
1	40	42.1
2	4	4.2
Unknown	17	17.9
Histology		
Undifferentiated pleomorphic sarcoma	28	29.5
Synovial sarcoma	19	20.0
Spindle cell sarcoma, NOS **	15	15.8
Leiomyosarcoma	10	10.5
Myxofibrosarcoma	7	7.4
Myxoid liposarcoma	3	3.2
Pleomorphic liposarcoma	3	3.2
Malignant peripheral nerve sheath tumour	3	3.2
Others	7	7.4
Site		
Lower limb	73	76.8
Upper limb	16	16.8
Trunk	6	6.3
Chemotherapy		
Epirubicin-ifosfamide	61	64.2
High-dose ifosfamide	24	25.2
Others	10	10.5
Radiotherapy		
Neoadjuvant	40	42.1
Adjuvant	36	37.9
Neoadjuvant and adjuvant	12	12.6
No	7	7.4
Pathological response		
≥90%	35	36.8
<90%	44	56.8
Not evaluable	10	6.3

* ECOG Eastern Cooperative Oncology Group; ** NOS: not otherwise specified.

Four patients were diagnosed with stage IV disease but were treated with chemotherapy with neoadjuvant intent to pursue surgery. These patients were included in the toxicity and response analyses, but not in the survival calculations.

Of the 95 patients treated with neoadjuvant chemotherapy, for 40 patients DNA was extracted from blood samples, and for 39 patients DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumour tissue. DNA was not available for 16 patients and, therefore, they were not included in the genetic analyses.

Regarding toxicity, only grade 3 and 4 events were recorded. Toxicities were graded using CTCAE v.4.03 [18]. The major toxicities included were anaemia, thrombocytopenia, neutropenia, febrile neutropenia, transaminitis and haemorrhagic cystitis. For evaluating the pathological response, we dichotomized the variable to higher or lower than 90% response, considering necrosis and other therapy-related changes according to an adaptation of the EORTC-STBSG recommendations [19].

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau) (IIBSP-SAR-2016-102). All patients gave a signed, informed consent.

2.2. Genotyping

We analysed 10 SNPs in 5 genes involved in anthracycline metabolism (*ABCB1*, *ABCC2*, *NQO1*, *CBR3*, and *SLC22A16*) and 2 SNPs in the *ALDH1A1* gene involved in ifosfamide catabolism. The selected SNPs were variants with functional evidence or previously reported clinical associations with chemotherapy regimens containing anthracyclines and/or ifosfamide [4,6,11]. All of the SNPs had a minor allele frequency (MAF) over 0.15 and an r^2 threshold of 0.8 in the European population [20]. Table 2 provides detailed information on the selected SNPs, and summarizes the studies with significant findings on the functionality of the SNPs or on pharmacogenetic associations.

Table 2. Selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in anthracycline and ifosfamide drug pathways.

Drug Pathway/Gene Symbol	refSeq	MAF (Minor Allele)	SNP Label	Protein Label	References for Rationale
ANTHRACYCLINES	<i>ABCB1</i>	rs1045642	c.3435T>C	p.Ile1145=	[7,14,21–25]
		rs2032582	c.2677T>G; c.2677T>A	p.Ser893Ala; p.Ser893Thr	[14,15,22,24]
	<i>ABCC2</i>	rs1128503	c.1236T>C	p.Gly412=	[14,26]
		rs3740066	c.3972C>T	p.Ile1324=	[13,27,28]
		rs2273697	c.1249G>A	p.Val417Ile	[13,27,29–32]
	<i>NQO1</i>	rs1800566	c.559C>T	p.Pro187Ser	[9,16,33]
	<i>CBR3</i>	rs8133052	c.11G>A	p.Cys4Tyr	[10]
		rs1056892	c.730G>A	p.Val244Met	[10,23,34]
	<i>SLC22A16</i>	rs6907567 *	c.312T>C	p.Asn104=	[29,31]
		rs12210538	c.1226T>C	p.Met409Thr	[15]
IFOSFAMIDE	<i>ALDH1A1</i>	rs3764435	c.1434-680T>G		[17]
		rs168351	c.1434-1115T>C		[17]

ABCB1: ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1, *ABCC2*: ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2, *NQO1*: NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1, *CBR3*: Carbonyl Reductase 3, *SLC22A16*: Solute Carrier Family 22 Member 16, *ALDH1A1*: Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1, SNP: single nucleotide polymorphism, MAF: minor allele frequency (1000 Genomes Project, European population; accession date: 31 March 2021), refSeq: reference sequence. Label according to the accession numbers: NM_001348946.1 (*ABCB1*), NM_000392.4 (*ABCC2*), NM_000903.2 (*NQO1*), NM_001236.3 (*CBR3*), NM_033125.3 (*SLC22A16*), NM_000689.4 (*ALDH1A1*). * rs6907567 is in linkage disequilibrium with rs714368 (D' : 1.0, r^2 : 1.0 in European population; data from the 1000 Genomes Project).

Genomic DNA was obtained by automatic extraction from peripheral whole-blood samples (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany) or using the GeneRead DNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) from FFPE tumour blocks. DNA was quantified and its quality was checked using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The SNPs were analysed by real-time PCR using TaqMan[®] SNP genotyping assays on a 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All the procedures were performed as specified in the manufacturers' instructions.

We performed a genotype quality control and observed that the *CBR3* rs8133052 variant had a high missing genotype rate (>90%) and the *SLC22A16* rs12210538 showed a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, and therefore we removed both of them from the association studies. The allele frequencies of the rest of the SNPs were similar to those reported in the 1000 Genomes project for the European population. All DNA samples had a call rate higher than 90% and therefore were included in the study.

2.3. Statistics

Recurrence-free survival (RFS) was defined as the time from the start of neoadjuvant chemotherapy until the date of local or distant recurrence, whichever occurred first. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis (biopsy) to death from any cause or last clinical follow-up. The associations between SNPs and toxicities or responses were evaluated with cross-tables using Chi-square or Fisher's exact test according to the variable characteristics. For the RFS and OS analyses, we used Kaplan-Meier curves and a log-rank test. Cox regression was applied for the multivariate analyses, including the statistically significant clinicopathological variables as covariables. Our sample size had over 80% statistical power to detect the effect of genetic variants with an $f = 0.25$ (two-sided test with $\alpha = 0.05$) (G*power version 3.1.9.2, Düsseldorf, Germany) [35].

All the SNPs were tested for Hardy-Weinberg equilibrium using a Chi-square test. For the tri-allelic variant *ABCB1* rs2032582, we considered the patients with GG genotype to be wild-type, patients with GT or GA genotypes to be heterozygous, and patients with TT, TA or AA genotypes to be homozygous for the low-frequency alleles, in order to enable cross-table analyses, as we did in a previous study [36]. We also removed patients with GA, TA and AA genotypes ($n = 5$) for haplotype analysis with PLINK. We considered co-dominant, dominant, and recessive models of inheritance whenever appropriate. Haplotype analyses for *ABCB1*, *ABCC2* and *ALDH1A1* were performed to explore the influence of specific allelic combinations on toxicity, pathological response and survival. Statistical significance was set at less than 0.05. Statistical analyses were performed using SPSS (version 25, IBM), and haplotype analyses using PLINK (v1.07, Shaun Purcell, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/> last accessed on 14 March 2022) [37].

3. Results

Patient and tumour characteristics are summarized in Table 1. The median OS in our series, excluding stage IV patients, was 79.7 (range 24.2–135.2) months, and the median RFS was 31.7 (range 19.1–44.3) months. Sex, age and administration of radiotherapy (RT) were found to be significantly associated with OS ($p = 0.042$, $p = 0.022$ and $p = 0.016$ respectively). These variables were included in the multivariate analyses for survival. For toxicity and response analyses, sex, age and administration of neoadjuvant radiotherapy were included in the multivariate analysis.

3.1. Genetic Variants and Toxicity

Fifty-four patients treated with anthracyclines and 71 treated with ifosfamide were available for toxicity analyses (Table 3).

For patients treated with anthracyclines, the *ABCC2* rs3740066 variant was significantly associated with the risk of febrile neutropenia, as 77.8% of patients (7/9) with TT genotype developed febrile neutropenia, compared to 33.3% (8/24) of heterozygous patients, and 27.8% (5/18) of patients homozygous for the most frequent C allele ($p = 0.040$). This statistical significance was maintained in the multivariate analysis ($p = 0.031$). For the *ABCC2* rs2273697, 48.6% (17/35) of GG homozygous patients developed febrile neutropenia compared to 26.7% (4/15) of heterozygous patients and no patients (0/4) with AA genotype ($p = 0.103$). In the multivariate analysis, a trend was observed toward the association between this SNP and the risk of febrile neutropenia ($p = 0.077$).

Table 3. Univariate associations between genetic variants and toxicities and pathological response.

	<i>n</i>	G3-4 Anaemia <i>n</i> (%)	G3-4 Thrombo- Cytopenia <i>n</i> (%)	G3-4 Neutropenia <i>n</i> (%)	Febrile Neutropenia <i>n</i> (%)	G3-4 Transaminitis <i>n</i> (%)	Haemorrhagic Cystitis <i>n</i> (%)	Pathological Response > 90% <i>n</i> (%)
ANTHRACYCLINES								
ABCC1—rs1045642								
GG	19	5 (26.3%)	1 (5.3%)	8 (42.1%)	7 (36.8%)	2 (10.5%)		5 (29.4%)
AG	27	7 (25.9%)	7 (25.9%)	17 (63%)	11 (40.7%)	1 (3.8%)		10 (41.7%)
AA	7	2 (28.6%)	1 (14.3%)	3 (42.9%)	3 (42.9%)	0 (0%)		1 (14.3%)
<i>p</i> -value		1 *	0.22 *	0.323 *	1 *	0.721 *		0.413 *
ABCC1—rs2032582								
CC	25	8 (32%)	2 (8%)	13 (52%)	10 (40%)	2 (8%)		9 (42.9%)
CT/CA	23	4 (17.4%)	6 (26.1%)	12 (52.2%)	8 (34.8%)	1 (4.5%)		6 (27.3%)
TT/TA	5	1 (20%)	0 (0%)	2 (40%)	2 (40%)	0 (0%)		0 (0%)
<i>p</i> -value		0.528 *	0.173 *	1 *	0.917 *	1 *		0.192 *
ABCC1—rs1128503								
GG	24	7 (29.2%)	3 (12.5%)	12 (50%)	10 (41.7%)	2 (8.3%)		7 (33.3%)
AG	24	5 (20.8%)	5 (20.8%)	13 (54.2%)	8 (33.3%)	1 (4.3%)		8 (36.4%)
AA	6	2 (33.3%)	1 (16.7%)	3 (50%)	3 (50%)	0 (0%)		1 (16.7%)
<i>p</i> -value		0.744	0.873 *	1 *	0.786 *	1 *		0.765 *
ABCC2—rs3740066								
CC	18	2 (11.21%)	2 (11.1%)	7 (38.7%)	5 (27.8%)	0 (0%)		5 (31.3%)
CT	24	7 (29.2%)	4 (16.7%)	13 (54.2%)	8 (33.3%)	2 (8.7%)		8 (36.4%)
TT	9	4 (44.4%)	2 (22.2%)	7 (77.8%)	7 (77.8%)	1 (11.1%)		3 (37.5%)
<i>p</i> -value		0.167 *	0.784 *	0.179 *	0.04 *	0.398		1.000 *
ABCC2—rs2273697								
GG	35	12 (34.3%)	8 (22.9%)	20 (57.1%)	17 (48.6%)	2 (5.9%)		13 (39.4%)
AG	15	2 (13.3%)	1 (6.7%)	6 (40%)	4 (26.7%)	1 (6.7%)		2 (15.4%)
AA	4	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (33.3%)
<i>p</i> -value		0.167 *	0.330 *	0.571 *	0.103 *	1 *		0.219 *
NQO1—rs1800566								
GG	34	10 (29.4%)	7 (20.6%)	21 (61.8%)	15 (44.1%)	2 (6.1%)		11 (35.5%)
AG	16	3 (18.8%)	1 (6.3%)	4 (25%)	3 (18.8%)	1 (6.3%)		2 (14.3%)
AA	4	1 (25%)	1 (25%)	3 (75%)	3 (75%)	0 (0%)		3 (75.0%)
<i>p</i> -value		0.785 *	0.403 *	>0.028 *	0.058 *			0.059 *
CBR3—rs1056892								
GG	30	9 (30%)	5 (16.7%)	17 (56.7%)	13 (43.3%)	2 (6.9%)		12 (42.9%)
AG	18	4 (22.2%)	3 (16.7%)	8 (44.4%)	5 (27.8%)	1 (5.6%)		1 (6.7%)
AA	6	1 (16.7%)	1 (16.7%)	3 (50%)	3 (50%)	0 (0%)		5 (50%)
<i>p</i> -value		0.825 *	1 *	0.792 *	0.479 *	1 *		0.024 *
SLC22A16—rs6907567								
AA	29	9 (31%)	5 (17.2%)	16 (55.2%)	12 (41.4%)	1 (3.6%)		11 (42.3%)
AG	18	3 (16.7%)	4 (22.2%)	10 (55.6%)	7 (38.9%)	2 (11.1%)		3 (18.8%)
GG	7	2 (28.6%)	0 (0%)	2 (28.6%)	2 (28.6%)	0 (0%)		2 (28.6%)
<i>p</i> -value		0.564 *	0.460 *	0.478	0.926	0.71		0.256 *
IFOSFAMIDE								
ALDH1A1—rs3764435								
AA	23	5 (21.7%)	2 (8.7%)	9 (39.1%)	6 (26.1%)	3 (13.6%)	1 (4.5%)	9 (40.9%)
AC	30	8 (26.7%)	5 (16.7%)	15 (50%)	11 (36.9%)	0 (0%)	1 (3.3%)	10 (38.5%)
CC	18	3 (16.7%)	1 (5.6%)	7 (38.9%)	7 (38.9%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (35.3%)
<i>p</i> -value		0.771 *	0.636	0.713 *	0.657 *		1 *	0.949 *

Table 3. Cont.

	<i>n</i>	G3-4 Anaemia <i>n</i> (%)	G3-4 Thrombo- Cytopenia <i>n</i> (%)	G3-4 Neutropenia <i>n</i> (%)	Febrile Neutropenia <i>n</i> (%)	G3-4 Transaminitis <i>n</i> (%)	Haemorrhagic Cystitis <i>n</i> (%)	Pathological Response > 90% <i>n</i> (%)
<i>ALDH1A1</i> —rs168351								
AA	56	14 (25%)	7 (12.5%)	24 (42.9%)	19 (33.9%)	2 (3.6%)	1 (1.8%)	17 (33.3%)
AG	14	1 (7.1%)	1 (7.1%)	6 (42.9%)	4 (28.6%)	0 (0%)	1 (7.7%)	8 (61.5%)
GG	2	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>p</i> -value		0.186 *	0.291 *	0.377 *	1 *		0.38 *	0.097 *

* F Fisher; G: grade; Statistically significant *p*-values are marked in bold.

Univariate haplotype analysis including *ABCC2* variants (rs3740066 | rs2273697) showed that the TG haplotype was significantly associated with febrile neutropenia ($p = 0.040$), and this association was retained in the multivariate analysis ($p = 0.040$). The same was found for the CA haplotype (univariate: $p = 0.006$ and multivariate: $p = 0.035$) (Supplementary Table S1).

When we studied *ABCB1* variants individually we obtained no associations with toxicity, although when we conducted haplotype analysis (rs1128503 | rs2032582 | rs1045642) the TGT haplotype was significantly associated with grade 3–4 anaemia in the multivariate analysis ($p = 0.02$) (Supplementary Table S1).

3.2. Genetic Variants and Survival

Fifty of the patients receiving neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy were eligible for survival analysis (Table 4). Two polymorphisms in *ABCC2* were found to be associated with survival: rs3740066 and rs2273697.

Table 4. Univariate associations between genetic variants and overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS).

SNP	<i>n</i>	OS		RFS					
		Probability ± s.e * at 3-y	Probability ± s.e at 5-y	HR (95% CI)	<i>p</i> - Value	Probability ± s.e at 3-y	Probability ± s.e at 5-y	HR (95% CI)	<i>p</i> - Value
ANTHRACYCLINES									
<i>ABCB1</i> —rs1045642									
GG	16	0.83 ± 0.11	0.68 ± 0.17	1 (reference)	0.352	0.47 ± 0.13	0.47 ± 0.13	1 (reference)	0.712
AG	26	0.73 ± 0.10	0.61 ± 0.11	1.57 (0.42–5.85)		0.48 ± 0.11	0.48 ± 0.11	1.01 (0.42–2.45)	
AA	7	1.00 ± 0.00	0.80 ± 0.18	0.41 (1.04–3.99)		0.68 ± 0.19	0.45 ± 0.22	0.61 (0.16–2.31)	
<i>ABCB1</i> —rs2032582									
CC	23	0.73 ± 0.11	0.65 ± 0.12	1 (reference)	0.253	0.45 ± 0.11	0.45 ± 0.11	1 (reference)	0.59
CT/CA	21	0.83 ± 0.09	0.64 ± 0.14	1.06 (0.35–3.17)		0.49 ± 0.12	0.49 ± 0.12	0.9 (0.39–2.09)	
TT/TA	5	1.00 ± 0.00	1.00 ± 1.00	0		0.80 ± 0.18	0.53 ± 0.25	0.462 (0.1–2.08)	
<i>ABCB1</i> —rs1128503									
GG	22	0.70 ± 0.12	0.59 ± 0.14	1 (reference)	0.316	0.42 ± 0.11	0.42 ± 0.11	1 (reference)	0.552
AG	22	0.85 ± 0.08	0.70 ± 0.12	0.62 (0.2–1.89)		0.53 ± 0.12	0.53 ± 0.12	0.71 (0.3–1.65)	
AA	6	1.00 ± 0.00	0.80 ± 0.18	0.23 (0.03–1.93)		0.67 ± 0.19	0.44 ± 0.22	0.54 (0.15–1.95)	
<i>ABCC2</i> —rs3740066									
CC	15	0.87 ± 0.09	0.75 ± 0.13	1 (reference)	0.049	0.60 ± 0.13	0.49 ± 0.14	1 (reference)	0.471
CT	23	0.88 ± 0.08	0.80 ± 0.11	1.19 (0.29–5.02)		0.45 ± 0.12	0.45 ± 0.12	1.01 (0.4–2.53)	
TT	9	0.70 ± 0.18	0.25 ± 0.20	4.97 (1.01–24.4)		0.39 ± 0.17	NR	1.89 (0.59–5.96)	
CC/CT	38	0.88 ± 0.06	0.78 ± 0.08	4.4 (1.21–16.31)	0.014	0.52 ± 0.09	0.46 ± 0.09	1.86 (0.68 (5.13)	0.220

Table 4. Cont.

SNP	<i>n</i>	OS		RFS					
		Probability ± s.e * at 3-y	Probability ± s.e at 5-y	HR (95% CI)	<i>p</i> - Value	Probability ± s.e at 3-y	Probability ± s.e at 5-y	HR (95% CI)	<i>p</i> - Value
ABCC2—rs2273697									
GG	33	0.80 ± 0.08	0.56 ± 0.12	1 (reference)	0.092	0.47 ± 0.10	0.47 ± 0.10	1 (reference)	0.125
AG	14	0.91 ± 0.08	0.91 ± 0.08	0.33 (0.07–1.53)		0.56 ± 0.13	0.44 ± 0.15	0.91 (0.37–2.25)	
AA	3	0.33 ± 0.27	0.33 ± 0.27	2.5 (0.54–11.67)		0.33 ± 0.27	0.33 ± 0.27	3.24 (0.9–11.58)	
GG/GA	47	0.84 ± 0.06	0.68 ± 0.09	3.36 (0.74–15.2)	0.095	0.50 ± 0.08	0.45 ± 0.09	3.35 (0.97–11.51)	0.042
NQO1—rs1800566									
GG	31	0.81 ± 0.08	0.59 ± 0.11	1 (reference)	0.486	0.50 ± 0.10	0.42 ± 0.11	1 (reference)	0.325
AG	15	0.76 ± 0.12	0.76 ± 0.12	0.79 (0.25–2.55)		0.56 ± 0.14	0.56 ± 0.14	0.769 (0.3–1.96)	
AA	4	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0		NR	NR	2.17 (0.61–7.69)	
CBR3—rs1056892									
GG	28	0.82 ± 0.08	0.67 ± 0.12	1 (reference)	0.33	0.41 ± 0.11	0.30 ± 0.12	1 (reference)	0.484
AG	16	0.72 ± 0.12	0.62 ± 0.14	1.8 (0.62–5.52)		0.55 ± 0.13	0.55 ± 0.13	0.87 (0.36–2.06)	
AA	6	1.00 ± 0.00	0.75 ± 0.22	0.5 (0.06–4.42)		0.67 ± 0.19	0.67 ± 0.19	0.41 (0.09–1.82)	
SLC22A16—rs6907567									
AA	28	0.76 ± 0.09	0.60 ± 0.11	1 (reference)	0.49	0.48 ± 0.10	0.42 ± 0.11	1 (reference)	0.279
AG	16	0.94 ± 0.06	0.94 ± 0.06	0.44 (0.09–2)		0.61 ± 0.13	0.61 ± 0.13	0.71 (0.37–2.26)	
GG	6	0.75 ± 0.22	0.38 ± 0.29	1.22 (0.27–5.67)		NR	NR	2.29 (0.73–7.22)	
SLC22A16—rs12210538									
AA	38	0.81 ± 0.07	0.61 ± 0.10	1 (reference)	0.163	0.48 ± 0.08	0.48 ± 0.08	1 (reference)	0.626
AG	8	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0		0.67 ± 0.20	0.33 ± 0.26	0.58 (0.17–1.96)	
GG	4	0.50 ± 0.25	0.50 ± 0.25	1.65 (0.37–7.42)		0.36 ± 0.28	0.36 ± 0.28	1.23 (0.28–5.31)	

The statistically significant *p*-values are marked in bold; * s.e: standard error; NR: not reached.

For rs3740066, the 5-year OS was 25% for patients with a TT genotype, compared to 78% for patients with CT or CC genotypes (HR: 4.4, 95% CI: 1.21–16.31; *p* = 0.014 in a recessive model). This significance was maintained in the multivariate analysis (HR: 5.4, 95% CI: 1.2–22.9; *p* = 0.024) (Figure 1). For the rs2273697 SNP, 45% of patients with GG or GA genotypes were free from recurrence at 5 years compared to 33% of patients with AA genotype (*p* = 0.042 in a recessive model), and this association was maintained in the multivariate analysis (HR: 4.6, 95% CI: 1.2–17.5; *p* = 0.024). We observed a trend toward a worse 5-year OS associated with this polymorphism (68% for GG or GA vs. 33% for AA; *p* = 0.095).

Haplotype analyses for *ABCB1* variants (rs1128503 | rs2032582 | rs1045642) showed that CGT (univariate: *p* = 0.042 and multivariate: *p* = 0.047) and TGT (multivariate: *p* < 0.001) haplotypes were significantly associated with OS. The haplotype TGT was also associated with RFS (univariate: *p* < 0.001 and multivariate: *p* = 0.001) (Supplementary Table S2).

Sixty-eight out of 71 patients receiving ifosfamide as part of neoadjuvant treatment were included in the survival analysis (Table 4). We observed a significant association between *ALDH1A1* rs3764435 and 5-year OS. The 5-year OS was 38% in patients with AA genotype compared to 71% in patients carrying the C allele (HR: 2.3, 95% CI: 1.02–5.17; *p* = 0.038 in a dominant model), although this significance was not maintained in the multivariate analysis (*p* = 0.095). This significant association was also observed with RFS, as patients with an AA genotype had a 5-year RFS of 25% compared to 51% of patients carrying the C allele in both the univariate and multivariate analysis (univariate: HR: 2.0, 95% CI: 1.04–3.99; *p* = 0.034 and multivariate: HR: 2.0, 95% CI: 1.01–3.9, *p* = 0.046).

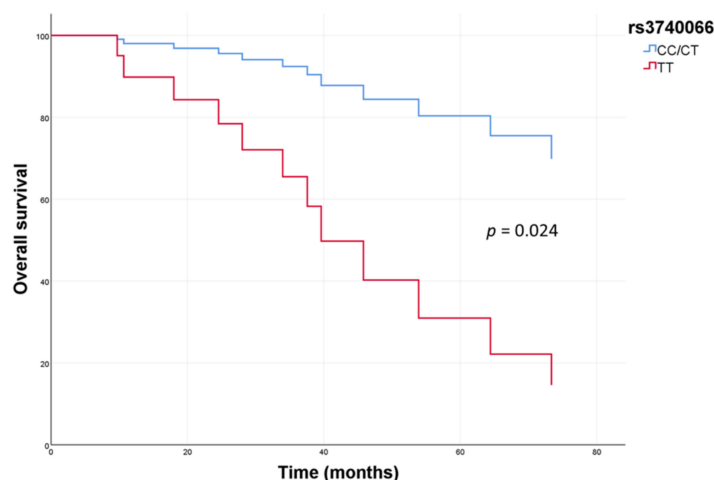


Figure 1. Overall survival according to *ABCC2* rs3740066 variant in patients treated with anthracyclines (multivariate analysis).

Haplotype analyses including both *ALDH1A1* variants (rs3764435 | rs168351) showed a significant association between the CA haplotype and OS (univariate: $p = 0.034$ and multivariate: $p = 0.021$). They also showed significant associations between CA and AA haplotypes and RFS in univariate ($p = 0.004$ and $p = 0.04$, respectively) and multivariate analysis ($p = 0.001$ and $p = 0.02$, respectively) (Supplementary Table S2).

3.3. Genetic Variants and Response

None of the evaluated SNPs were correlated with pathological response to treatment in the multivariate analysis (Table 3).

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study describing the clinical significance of polymorphisms involved in the anthracycline and ifosfamide metabolic pathways in localised high-risk STS. Both drugs have high toxicity rates, especially when used in combination, and there are huge interindividual differences in grades of toxicity between patients. We found that SNPs rs3740066 and rs2273697 in *ABCC2* were significantly associated with febrile neutropenia and survival in anthracycline-treated patients. Additionally, the SNPs rs3764435 and rs168351 in *ALDH1A1* were significantly associated with survival in patients who received ifosfamide.

Doxorubicin continues to be the cornerstone in the treatment of sarcomas; however, it involves not negligible dose-limiting side effects (e.g., cardiotoxicity, myelosuppression, secondary leukaemia), and there are no validated predictive factors to identify patients at risk of these dose-limiting toxicities [38]. *ABCC2* (MRP2) is an efflux transporter involved in doxorubicin exposure, which plays a central role in detoxification by secreting metabolites into bile and mediates cellular resistance to chemotherapies such as vincristine, doxorubicin and cisplatin [39]. Different polymorphisms in its encoding gene have been identified as being involved in haematological and gastrointestinal toxicities [13]. Tecza et al. conducted a study to evaluate genetic and clinical risk factors in a group of 324 breast cancer patients that received FAC chemotherapy (fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide) [13]. They described a higher risk of grade 1–3 nausea for patients with CT/TT genotypes and severe neutropenia in patients with TT genotype for rs3740066. They also found the AA genotype for rs2273697 to be protective for grade 1–2 anaemia compared to AG or GG genotypes. Additionally, the GG genotype for rs2273697 has been found to be associated with decreased progression-free survival (PFS) in people with gastrointestinal stromal

tumours when treated with imatinib [29], and also with worse OS and PFS in patients with mesothelioma treated with cisplatin and pemetrexed [30].

Unfortunately, there is no evidence in the literature that correlates *ABCC2* polymorphisms with the outcome and anthracycline efficacy in STS. In the present study, we found *ABCC2* rs3740066 to be associated with toxicity and decreased survival in patients with STS: patients homozygous for the T allele were more susceptible to haematological toxicity (febrile neutropenia), in line with the results reported by Tecza et al., and had shorter OS. For the other polymorphism studied in this gene, G allele carriers for rs2273697 showed longer RFS, contrary to other studies [29,30]. In addition, the TG (rs3740066 | rs2273697) haplotype was also statistically significant for higher risk of febrile neutropenia. These findings are supported by previous studies that show *ABCC2* variants to have an effect on the transporter activity. *ABCC2* rs3740066 is in linkage disequilibrium with the rs717620 promoter variant that has been associated with reduced promoter activity and with lower *ABCC2* mRNA levels [31,40], and rs2273697 is a nonsynonymous variant. Pharmacokinetic studies have shown that the T allele for rs3740066 was associated with higher areas under the curve for irinotecan metabolites, probably due to decreased activity of the *ABCC2* transporter [27,28], and that the A allele for rs2273697 was associated with decreased systemic drug exposure [27,31,32]. These data might explain the higher risk of haematological toxicity and the association with survival observed in our sample. It should be noted that most of the published literature is focused on detecting a risk of anthracycline-related cardiotoxicity; this was not an objective in our study as cumulative anthracycline dose was low and no cardiotoxicity was reported.

ABCB1 is another multidrug efflux transporter that has been postulated to be involved in doxorubicin resistance, drug disposition, toxicity and response [4,6]. Three SNPs in this gene—rs1128503, rs2032582 and rs1045642—are in strong linkage disequilibrium [7] and are thought to play a role in drug response and disease susceptibility. In a pharmacogenetic study conducted by Caronia et al. in patients with osteosarcoma, TTT haplotype was associated with better survival [26], and the effect was higher for rs1128503, with T allele being protective for OS. In our study, we observed an association between TGT haplotype and OS, RFS and grade 3–4 anaemia, and also between CGT haplotype and OS. These allele combinations may modify the activity of the transporter and affect the therapeutic effectiveness of the chemotherapy, with an impact on survival and toxicity. It is worth mentioning that these two haplotypes are found at a very low frequency (3–7%) and, therefore, further studies are needed to establish their relevance.

Ifosfamide is one of the most useful drugs in the treatment of sarcomas; nevertheless, it is also associated with important side effects (e.g., urotoxicity, encephalopathy) that may limit its utilisation [11]. *ALDH1A1* has been characterised as a determinant of cellular sensitivity to cyclophosphamide and other oxazaphosphorines [41]. It also contributes to alcohol metabolism and has been related to alcohol dependence [42]. Yao et al. published a pharmacogenetic study of 882 breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy including anthracyclines and ifosfamide. Patients with the AA genotype for rs3764435 and patients with AA (rs3764435 | rs168351) haplotype had a higher risk of grade 3–4 haematological toxicity than C allele carriers [17]. In our sample, we could not confirm the associations of *ALDH1A1* variants with toxicity. Nevertheless, we did find a significant association between rs3764435 and CA haplotype with worse OS and RFS.

Published data on ifosfamide pharmacogenetics are scarce and, to the best of our knowledge, no studies have been previously conducted in STS. However, high expression of *ALDH1A1* has been associated with resistance to chemotherapy in *in vitro* studies [43–45], and with worse disease-free survival and OS after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [46]. The *ALDH1A1* enzyme participates in the conversion process of ifosfamide to its active metabolite, by the detoxification of aldoifosfamide. Thus, altered *ALDH1A1* function due to common genetic variants may affect the availability of the active metabolite, and therefore compromise patients' survival. The rs3764435 *ALDH1A1* is an intronic variant that affects several putatively regulatory motifs, indicating that it may have an

impact on the regulation of ALDH1A1 expression, as it has been reported for other intronic variants in the genome [47]. Further research is needed to delineate *ALDH1A1* variants as survival predictors.

In the present study, we have identified novel associations between *ABCC2* and *ALDH1A1* polymorphisms and toxicity and efficacy of STS treatment that add knowledge to this field of research. However, our study has certain limitations. The sample size is moderate, but unique considering STS is a rare cancer and neoadjuvant chemotherapy is not widely used. Additionally, there is inherent variability in STS histology, prognosis and chemosensitivity that is also represented in our series. In addition, DNA was isolated from peripheral blood and from FFPE tissue, and although a high correlation has been described [48], this might have influenced the genotyping results. Finally, available functionality data of the variants with significant associations in our study is not sufficient to draw definitive conclusions. Therefore, we consider this study the first hypothesis-generating pharmacogenetic study in a move towards personalizing neoadjuvant treatment in soft tissue sarcoma.

5. Conclusions

In the present study, we have established for the first time a relationship between *ABCC2* and *ALDH1A1* polymorphisms and toxicity and survival in high-risk STS patients receiving neoadjuvant chemotherapy. Pharmacogenetics in STS could help identify patients at lower risk of developing toxicity and those who would benefit most from neoadjuvant treatment.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jpm12040618/s1>, Supplementary Table S1 (Haplotype association analysis of *ABCC2*, *ABCB1* and *ALDH1A1* polymorphisms with toxicity/response); Supplementary Table S2 (Haplotype association analysis of *ABCC2*, *ABCB1* and *ALDH1A1* polymorphisms with survival).

Author Contributions: All authors have made substantial contributions as follows: Conceptualization, A.C.V.M., J.S. and A.S.; methodology, A.C.V.M., J.S. and A.S.; formal analysis, A.C.V.M., J.S. and M.J.A.; investigation, A.C.V.M., J.S., O.B. and A.A.-B.; resources, A.C.V.M., J.S., S.B., R.O., A.L.-P., P.C., I.G., K.M., A.P., L.T., M.F., S.V. and M.J.Q.; data curation, A.C.V.M., J.S. and M.J.A.; writing—original draft preparation, A.C.V.M., J.S. and A.S.; writing—review and editing, A.C.V.M., J.S., M.J.A. and A.S.; supervision, J.S. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau) (IIBSP-SAR-2016-102) approved 15 February 2017.

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are not publicly available due to ethical committee regulations. The data are available on request from the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Soft Tissue and Bone Tumours WHO Classification of Tumours*, 5th ed.; IARC: Lyon, France, 2020; Volume 3.
2. Casali, P.G.; Abecassis, N.; Bauer, S.; Biagini, R.; Bielack, S.; Bonvalot, S.; Boukovinas, I.; Bovee, J.V.M.G.; Brodowicz, T.; Broto, J.; et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2018**, *29* (Suppl. 4), iv51–iv67. [CrossRef] [PubMed]
3. Baldini, E.H.; Le Cesne, A.; Trent, J.C. Neoadjuvant Chemotherapy, Concurrent Chemoradiation, and Adjuvant Chemotherapy for High-Risk Extremity Soft Tissue Sarcoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2018**, *38*, 910–915. [CrossRef] [PubMed]

4. Thorn, C.F.; Oshiro, C.; Marsh, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeod, H.; Klein, T.E.; Altman, R.B. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharm. Genom.* **2011**, *21*, 440. Available online: <http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId> (accessed on 5 February 2019). [CrossRef] [PubMed]
5. Gewirtz, D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727–741. [CrossRef]
6. Lal, S.; Mahajan, A.; Chen, W.N.; Chowbay, B. Pharmacogenetics of Target Genes across Doxorubicin Disposition Pathway: A Review. *Curr. Drug Metab.* **2010**, *11*, 115–128. [CrossRef]
7. Fung, K.L.; Gottesman, M.M. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteom.* **2009**, *1794*, 860–871. [CrossRef]
8. Okabe, M.; Unno, M.; Harigae, H.; Kaku, M.; Okitsu, Y.; Sasaki, T.; Mizoi, T.; Shiiba, K.; Takanaga, H.; Terasaki, T.; et al. Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: A doxorubicin importer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *333*, 754–762. Available online: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X05011873> (accessed on 21 May 2019). [CrossRef]
9. Fagerholm, R.; Hofstetter, B.; Tommiska, J.; Aaltonen, K.; Vrtel, R.; Syrjäkoski, K.; Kallioniemi, A.; Kilpivaara, O.; Mannermaa, A.; Kosma, V.-M.; et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 844–853. Available online: <https://www.nature.com/articles/ng.155> (accessed on 30 July 2008). [CrossRef]
10. Fan, L.; Goh, B.-C.; Wong, C.-I.; Sukri, N.; Lim, S.-E.; Tan, S.-H.; Guo, J.-Y.; Lim, R.; Yap, H.-L.; Khoo, Y.-M.; et al. Genotype of human carbonyl reductase CBR3 correlates with doxorubicin disposition and toxicity. *Pharm. Genom.* **2008**, *18*, 623–631. Available online: <http://www.bioconductor.org> (accessed on 4 December 2018). [CrossRef]
11. Lowenberg, D.; Thorn, C.F.; Desta, Z.; Flockhart, D.A.; Altman, R.B.; Klein, T.E. PharmGKB summary: Ifosfamide pathways, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharm. Genom.* **2014**, *24*, 133. Available online: <http://www.pharmgkb.org/pathway/PA2037> (accessed on 5 February 2019). [CrossRef]
12. Evans, W.E.; McLeod, H.L. Pharmacogenomics—Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 538–549. [CrossRef] [PubMed]
13. Tęcza, K.; Pamuła-Piłat, J.; Lanuszeńska, J.; Butkiewicz, D.; Grzybowska, E. Pharmacogenetics of toxicity of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients. *Oncotarget* **2018**, *9*, 9114–9136. [CrossRef]
14. Lal, S.; Wong, Z.W.; Sandanaraj, E.; Xiang, X.; Ang, P.C.S.; Lee, E.J.D.; Chowbay, B. Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 816–823. [CrossRef] [PubMed]
15. Bray, J.; Sludden, J.; Griffin, M.J.; Cole, M.; Verrill, M.; Jamieson, D.; Boddy, A.V. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 1003–1009. [CrossRef]
16. Geng, R.; Chen, Z.; Zhao, X.; Qiu, L.; Liu, X.; Liu, R.; Guo, W.; He, G.; Li, J.; Zhu, X. Oxidative Stress-Related Genetic Polymorphisms Are Associated with the Prognosis of Metastatic Gastric Cancer Patients Treated with Epirubicin, Oxaliplatin and 5-Fluorouracil Combination Chemotherapy. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e116027. [CrossRef] [PubMed]
17. Yao, S.; Sucheston, L.E.; Zhao, H.; Barlow, W.E.; Zirpoli, G.; Liu, S.; Moore, H.C.F.; Budd, G.T.; Hershman, D.L.; Davis, W.; et al. Germline genetic variants in ABCB1, ABCC1 and ALDH1A1, and risk of hematological and gastrointestinal toxicities in a SWOG Phase III trial S0221 for breast cancer. *Pharm. J.* **2013**, *14*, 241–247. [CrossRef] [PubMed]
18. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0. 2009. Available online: <http://www.meddrmsso.com> (accessed on 19 April 2021).
19. Wardelmann, E.; Haas, R.L.; Bovée, J.V.M.G.; Terrier, P.; Lazar, A.; Messiou, C.; Lepechoux, C.; Hartmann, W.; Collin, F.; Fisher, C.; et al. Evaluation of response after neoadjuvant treatment in soft tissue sarcomas; the European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC ESTBSG) recommendations for pathological examination and reporting. *Eur. J. Cancer* **2016**, *53*, 84–95. [CrossRef] [PubMed]
20. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* **2015**, *526*, 68–74. [CrossRef]
21. Gregers, J.; Gréen, H.; Christensen, I.J.; Dalhoff, K.; Schroeder, H.; Carlsen, N.; Rosthøj, S.; Lausen, B.; Schmiegelow, K.; Peterson, C. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharm. J.* **2015**, *15*, 372–379. [CrossRef]
22. Ikeda, M.; Tsuji, D.; Yamamoto, K.; Kim, Y.-I.; Daimon, T.; Iwabe, Y.; Hatori, M.; Makuta, R.; Hayashi, H.; Inoue, K.; et al. Relationship between ABCB1 gene polymorphisms and severe neutropenia in patients with breast cancer treated with doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2015**, *30*, 149–153. [CrossRef]
23. Hertz, D.L.; Caram, M.V.; Kidwell, K.M.; Thibert, J.N.; Gersch, C.; Seewald, N.J.; Smerage, J.; Rubenfire, M.; Henry, N.L.; Cooney, K.A.; et al. Evidence for association of SNPs in ABCB1 and CBR3, but not RAC2, NCF4, SLC28A3 or TOP2B, with chronic cardiotoxicity in a cohort of breast cancer patients treated with anthracyclines. *Pharmacogenomics* **2016**, *17*, 231–240. [CrossRef] [PubMed]
24. Maggini, V.; Buda, G.; Martino, A.; Presciuttini, S.; Galimberti, S.; Orciuolo, E.; Barale, R.; Petrini, M.; Rossi, A.M. MDR1 diplotypes as prognostic markers in multiple myeloma. *Pharm. Genom.* **2008**, *18*, 283–289. Available online: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=18408561> (accessed on 5 February 2019). [CrossRef] [PubMed]

25. Cizmarikova, M.; Wagnerova, M.; Schonova, L.; Habalova, V.; Kohut, A.; Linkova, A.; Sarissky, M.; Mojzis, J.; Mirossay, L. MDR1 (C3435T) polymorphism: Relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcome. *Pharm. J.* **2009**, *10*, 62–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Caronia, D.; Patiño-García, A.; Martínez, A.P.; Pita, G.; Moreno, L.T.; Zalacain-Díez, M.; Molina, B.; Colmenero, I.; Sierrasesúmag, L.; Benítez, J.F.; et al. Effect of ABCB1 and ABCC3 Polymorphisms on Osteosarcoma Survival after Chemotherapy: A Pharmacogenetic Study. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26091. [\[CrossRef\]](#)
27. Fujita, K.-I.; Nagashima, F.; Yamamoto, W.; Endo, H.; Sunakawa, Y.; Yamashita, K.; Ishida, H.; Mizuno, K.; Matsunaga, M.; Araki, K.; et al. Association of ATP-Binding Cassette, Sub-family C, Number 2 (ABCC2) Genotype with Pharmacokinetics of Irinotecan in Japanese Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Irinotecan Plus Infusional 5-Fluorouracil/Leucovorin (FOLFIRI). *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 2137–2142. [\[CrossRef\]](#)
28. Innocenti, F.; Kroetz, D.L.; Schuetz, E.; Dolan, M.E.; Ramírez, J.; Relling, M.; Chen, P.; Das, S.; Rosner, G.L.; Ratain, M.J. Comprehensive Pharmacogenetic Analysis of Irinotecan Neutropenia and Pharmacokinetics. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 2604–2614. [\[CrossRef\]](#)
29. Ravegnini, G.; Urbini, M.; Simeon, V.; Genovese, C.; Astolfi, A.; Nannini, M.; Gatto, L.; Saponara, M.; Ianni, M.; Indio, V.; et al. An exploratory study by DMET array identifies a germline signature associated with imatinib response in gastrointestinal stromal tumor. *Pharm. J.* **2018**, *19*, 390–400. [\[CrossRef\]](#)
30. Goričar, K.; Kovač, V.; Dolžan, V. Clinical-pharmacogenetic models for personalized cancer treatment: Application to malignant mesothelioma. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, srep46537. [\[CrossRef\]](#)
31. Haenisch, S.; May, K.; Wegner, D.; Caliebe, A.; Cascorbi, I.; Siegmund, W. Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression and rifampicin-type induction of ABCC2 and on bioavailability of talinolol. *Pharm. Genom.* **2008**, *18*, 357–365. [\[CrossRef\]](#)
32. Lian, G.; Yuan, J.; Gao, Y. In vitro Transport Ability of ABCC2 (G1249A) Polymorphic Variant towards Anticancer Drugs. *OncoTargets Ther.* **2020**, *13*, 1413–1419. [\[CrossRef\]](#)
33. Jamieson, D.; Cresti, N.; Bray, J.; Sludden, J.; Griffin, M.J.; Hawsawi, N.M.; Famie, E.; Mould, E.V.; Verrill, M.W.; May, F.E.; et al. Two minor NQO1 and NQO2 alleles predict poor response of breast cancer patients to adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide therapy. *Pharm. Genom.* **2011**, *21*, 808–819. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Serie, D.J.; Crook, J.E.; Necela, B.M.; Dockter, T.J.; Wang, X.; Asmann, Y.W.; Fairweather, D.; Bruno, K.A.; Colon-Otero, G.; Perez, E.A.; et al. Genome-wide association study of cardiotoxicity in the NCCTG N9831 (Alliance) adjuvant trastuzumab trial. *Pharm. Genom.* **2017**, *27*, 378–385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Faul, F.; Erdfelder, E.; Buchner, A.; Lang, A.-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav. Res. Methods* **2009**, *41*, 1149–1160. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Riera, P.; Artigas-Baleri, A.; Salazar, J.; Sebío, A.; Virgili, A.C.; Arranz, M.J.; Páez, D. ABCB1 Genetic Variants as Predictors of Irinotecan-Induced Severe Gastrointestinal Toxicity in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 973. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.R.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; de Bakker, P.I.W.; Daly, M.J.; et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 559–575. [\[CrossRef\]](#)
38. Jamieson, D.; Boddy, A.V. Pharmacogenetics of genes across the doxorubicin pathway. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2011**, *7*, 1201–1210. [\[CrossRef\]](#)
39. Chan, L.M.; Lowes, S.; Hirst, B.H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: Efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 25–51. [\[CrossRef\]](#)
40. Haenisch, S.; Zimmermann, U.; Dazert, E.; Wruck, C.J.; Dazert, P.; Siegmund, S.; Kroemer, H.K.; Warzok, R.W.; Cascorbi, I. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharm. J.* **2006**, *7*, 56–65. [\[CrossRef\]](#)
41. Vasiliou, V.; Pappa, A. Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases: Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology* **2000**, *61*, 192–198. Available online: <https://www.karger.com/Article/FullText/28400> (accessed on 31 May 2021). [\[CrossRef\]](#)
42. Liu, J.; Zhou, Z.; Hodgkinson, C.A.; Yuan, Q.; Shen, P.-H.; Mulligan, C.J.; Wang, A.; Gray, R.R.; Roy, A.; Virkkunen, M.; et al. Haplotype-Based Study of the Association of Alcohol-Metabolizing Genes with Alcohol Dependence in Four Independent Populations. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2010**, *35*, 304–316. [\[CrossRef\]](#)
43. Bunting, K.D.; Townsend, A.J. De novo expression of transfected human class 1 aldehyde dehydrogenase (ALDH) causes resistance to oxazaphosphorine anti-cancer alkylating agents in hamster V79 cell lines. Elevated class 1 ALDH activity is closely correlated with reduction in DNA interstrand cross-linking and lethality. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11884–11890. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Moreb, J.S.; Schweder, M.; Gray, B.; Zucali, J.; Zori, R. In Vitro Selection for K562 Cells with Higher Retrovirally Mediated Copy Number of Aldehyde Dehydrogenase Class-1 and Higher Resistance to 4-Hydroperoxycyclophosphamide. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 611–619. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Canuto, R.A.; Muzio, G.; Salvo, R.A.; Maggiora, M.; Trombetta, A.; Chantepie, J.; Fournet, G.; Reichert, U.; Quash, G. The effect of a novel irreversible inhibitor of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 on tumour cell growth and death. *Chem. Interact.* **2001**, *130*–132, 209–218. [[CrossRef](#)]
46. Khoury, T.; Ademuyiwa, F.; Chandraseekhar, R.; Jabbour, M.; DeLeo, A.B.; Ferrone, S.; Wang, Y.; Wang, X. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy. *Mod. Pathol.* **2011**, *25*, 388–397. [[CrossRef](#)]
47. Claussnitzer, M.; Dankel, S.N.; Kim, K.-H.; Quon, G.; Meuleman, W.; Haugen, C.; Glunk, V.; Sousa, I.S.; Beaudry, J.L.; Puvion, V.; et al. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 895–907. [[CrossRef](#)]
48. McWhinney, S.R.; McLeod, H.L. Using germline genotype in cancer pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics* **2009**, *10*, 489–493. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19650256/> (accessed on 25 August 2021). [[CrossRef](#)]

Supplementary Table S1. Haplotype association analysis of *ABCC2*, *ABCB1* and *ALDH1A1* polymorphisms with toxicity/response.

	Anthracycline pathway							Ifosfamide pathway						
	<i>ABCB1</i> (rs1128503 rs2032582 rs1045642)	TTT	TGT	CGT	TGC	CGC		<i>ABCC2</i> (rs3740066 rs2273697)	TA	CA	TG	CG	CG	
Grade 3-4 anaemia	Frequency affected	0.244	0.075	0.074	0.003	0.604		0.002	0.075	0.575	0.348	0.003	0.091	0.435
	Frequency unaffected	0.303	0.013	0.066	0.013	0.605		0.016	0.260	0.339	0.384	0.013	0.105	0.459
	<i>p</i> -value (univariate)	0.555	0.098	0.888	0.643	0.999		0.580	0.046	0.034	0.742	0.619	0.818	0.804
	<i>p</i> -value (multivariate)	0.258	0.02	0.917	0.601	0.549		0.79	0.165	0.104	0.683	0.481	0.846	0.618
Grade 3-4 thrombocytopenia	Frequency affected	0.379	0.01	0.111	0	0.5		0	0.063	0.5	0.438	0.006	0.057	0.432
	Frequency unaffected	0.269	0.033	0.060	0.013	0.626		0.015	0.241	0.381	0.364	0.012	0.107	0.457
	<i>p</i> -value (univariate)	0.344	0.584	0.432	0.633	0.320		0.627	0.109	0.371	0.574	0.834	0.527	0.850
	<i>p</i> -value (multivariate)	0.989	0.786	0.361	0.995	0.914		0.996	0.237	0.219	0.938	0.708	0.508	0.609
Grade 3-4 neutropenia	Frequency affected	0.288	0.038	0.092	0.001	0.580		0.021	0.164	0.479	0.336	0.021	0.108	0.447
	Frequency unaffected	0.287	0.020	0.043	0.020	0.630		0.002	0.269	0.310	0.419	0.004	0.096	0.459
	<i>p</i> -value (univariate)	0.989	0.587	0.314	0.345	0.601		0.380	0.197	0.083	0.390	0.331	0.816	0.888
	<i>p</i> -value (multivariate)	0.981	0.411	0.247	0.511	0.422		0.695	0.398	0.104	0.227	0.501	0.787	0.869
Febrile neutropenia	Frequency affected	0.289	0.028	0.099	0.0009	0.584		0.026	0.074	0.524	0.376	0.025	0.100	0.496
	Frequency unaffected	0.287	0.031	0.050	0.016	0.617		0.003	0.303	0.319	0.374	0.004	0.102	0.432
	<i>p</i> -value (univariate)	0.982	0.931	0.331	0.447	0.738		0.305	0.006	0.040	0.984	0.262	0.968	0.469
	<i>p</i> -value (multivariate)	0.832	0.781	0.240	0.621	0.652		0.474	0.035	0.040	0.697	0.487	0.93	0.574
Vomiting	Frequency affected	0	0	0	0	1		0.012	0.208	0.398	0.382	0	0	1
	Frequency unaffected	0.293	0.030	0.070	0.011	0.597		0.030	0.829	0.048	1.062	0.011	0.103	0.460
	<i>p</i> -value (univariate)	0.365	0.804	0.699	0.883	0.248		0.862	0.363	0.827	0.303	0.881	0.632	0.194
	<i>p</i> -value (multivariate)	0.996	0.999	0.988	0.995	0.995		0.976	0.491	0.833	0.57	1	0.997	0.995
Grade 3-4 transaminitis	Frequency affected	0.167	0	0	0	0.833		0.009	0.158	0.658	0.175	0	0.333	0
	Frequency unaffected	0.290	0.032	0.074	0.011	0.593		0.013	0.221	0.381	0.385	0.012	0.085	0.481
	<i>p</i> -value (univariate)	0.514	0.657	0.489	0.794	0.241		0.928	0.716	0.178	0.303	0.790	0.044	0.021
	<i>p</i> -value (multivariate)	0.896	0.995	0.987	0.995	0.376		0.924	0.609	0.283	0.445	0.997	0.121	0.994
Haemorrhagic cystitis	Frequency affected							0	0.25	0.25	0.5	0	0.25	0.5
	Frequency unaffected											0.011	0.091	0.467
	<i>p</i> -value (univariate)											0.829	0.289	0.392
	<i>p</i> -value (multivariate)											0.997	0.387	0.463
Pathological response >90%	Frequency affected	0.242	0.068	0.065	0.002	0.623		0.031	0.094	0.406	0.469	0.024	0.136	0.416
	Frequency unaffected	0.339	0	0.065	0.015	0.582		0.003	0.247	0.397	0.353	0.004	0.084	0.472
	<i>p</i> -value (univariate)	0.331	0.033	0.996	0.567	0.698		0.264	0.077	0.928	0.281	0.288	0.342	0.538
	<i>p</i> -value (multivariate)	0.269	0.995	0.810	0.528	0.503		0.511	0.2	0.783	0.471	0.544	0.217	0.415

The statistically significant *p*-values are marked in bold.

Supplementary Table S2. Haplotype association analysis of *ABCC2*, *ABCB1* and *ALDH1A1* polymorphisms with survival.

Haplotype	Overall survival		Recurrence-free survival	
	<i>p</i> -value univariate	<i>p</i> -value multivariate	<i>p</i> -value univariate	<i>p</i> -value multivariate
Anthracycline pathway				
<i>ABCB1</i> (rs1128503 rs2032582 rs10456429)				
TTT	0.243	0.083	0.394	0.135
TTC	0.459	0.498	0.540	0.545
TGT	0.059	<0.001	<0.001	0.001
CGT	0.042	0.047	0.109	0.112
CGC	0.171	0.053	0.263	0.092
<i>ABCC2</i> (rs3740066 rs2273697)				
TA	0.815	0.988	0.402	0.275
CA	0.544	0.835	0.486	0.869
TG	0.091	0.185	0.095	0.193
CG	0.216	0.224	0.167	0.133
Ifosfamide pathway				
<i>ALDH1A1</i> (rs3764435 rs168351)				
CG	0.313	0.579	0.363	0.665
AG	0.405	0.369	0.284	0.228
CA	0.034	0.021	0.004	0.001
AA	0.139	0.094	0.040	0.020

The statistically significant *p*-values are marked in bold.

4.2. Article 2

Virgili AC, Salazar J, Gallardo A, López-Pousa A, Terés R, Bagué S, Orellana R, Fumagalli C, Mangues R, Alba-Castellón L, Unzueta U, Casanova I, Sebio A. CXCR4 Expression as a Prognostic Biomarker in Soft Tissue Sarcomas. *Diagnostics (Basel)*. 2024 Jun 6;14(11):1195. doi: 10.3390/diagnostics14111195. PMID: 38893721; PMCID: PMC11172351.

Article

CXCR4 Expression as a Prognostic Biomarker in Soft Tissue Sarcomas

Anna C. Virgili ^{1,2,3} , Juliana Salazar ^{3,*} , Alberto Gallardo ⁴ , Antonio López-Pousa ^{1,3}, Raúl Terés ^{1,3}, Silvia Bagué ⁴ , Ruth Orellana ⁴ , Caterina Fumagalli ⁴, Ramon Mangués ^{5,6,7} , Lorena Alba-Castellón ^{5,6,7} , Ugutz Unzueta ^{5,6,7} , Isolda Casanova ^{5,6,7} and Ana Sebio ^{1,3,*}

¹ Department of Medical Oncology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; avirgili@santpau.cat (A.C.V.); alopezp@santpau.cat (A.L.-P.); rteres@santpau.cat (R.T.)

² Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain

³ Translational Medical Oncology Laboratory, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain

⁴ Department of Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; agallardo@santpau.cat (A.G.); sbaguer@santpau.cat (S.B.); rorellana@santpau.cat (R.O.); cfumagalli@santpau.cat (C.F.)

⁵ Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain; rmangués@santpau.cat (R.M.); lalba@santpau.cat (L.A.-C.); unzueta@santpau.cat (U.U.); icasanova@santpau.cat (I.C.)

⁶ CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona, Spain

⁷ Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC), 08916 Badalona, Spain

* Correspondence: jsalazar@santpau.cat (J.S.); asebio@santpau.cat (A.S.)

Abstract: Poor long-term survival in localized high-risk soft tissue sarcomas (STSs) of the extremities and trunk highlights the need to identify new prognostic factors. CXCR4 is a chemokine receptor involved in tumor progression, angiogenesis, and metastasis. The aim of this study was to evaluate the association between CXCR4 expression in tumor tissue and survival in STSs patients treated with neoadjuvant therapy. CXCR4 expression was retrospectively determined by immunohistochemical analysis in serial specimens including initial biopsies, tumors post-neoadjuvant treatment, and tumors after relapse. We found that a positive cytoplasmatic expression of CXCR4 in tumors after neoadjuvant treatment was a predictor of poor recurrence-free survival (RFS) ($p = 0.003$) and overall survival ($p = 0.019$) in synovial sarcomas. We also found that positive nuclear CXCR4 expression in the initial biopsies was associated with poor RFS ($p = 0.022$) in undifferentiated pleomorphic sarcomas. In conclusion, our study adds to the evidence that CXCR4 expression in tumor tissue is a promising prognostic factor for STSs.

Keywords: soft tissue sarcomas; synovial sarcomas; undifferentiated pleomorphic sarcomas; prognostic factor; CXCR4



Citation: Virgili, A.C.; Salazar, J.; Gallardo, A.; López-Pousa, A.; Terés, R.; Bagué, S.; Orellana, R.; Fumagalli, C.; Mangués, R.; Alba-Castellón, L.; et al. CXCR4 Expression as a Prognostic Biomarker in Soft Tissue Sarcomas. *Diagnostics* **2024**, *14*, 1195. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14111195>

Academic Editor: Consolato M. Sergi

Received: 25 April 2024

Revised: 30 May 2024

Accepted: 5 June 2024

Published: 6 June 2024



Copyright: © 2024 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/>).

1. Introduction

Soft tissue sarcomas (STSs) include more than 80 histological subtypes of rare tumors derived from mesenchymal tissues [1]. Standard treatment for localized disease is wide local excision [2], and known prognostic factors are tumor size, location depth, and high grade. Several validated nomograms are used to predict the risk of recurrence [3]. Neoadjuvant chemotherapy, based on a combination of anthracyclines and ifosfamide and/or radiotherapy are additional treatment options for patients with STSs of the extremities and trunk at high risk of relapse [4]. However, despite multimodality treatment, 40 to 50% of patients develop distant metastases. Current treatment for these patients is systemic chemotherapy but long-term survival remains poor [5]. To improve the survival rates, it is therefore essential to select the best treatment option for each patient based on histological subtype, tumor biology, and prognostic factors.

The CXCR4 chemokine receptor is a promising prognostic biomarker in cancer. CXCR4 is a G-protein coupled receptor located on the cell surface, but it is also expressed in cytoplasm and the nucleus, and its subcellular localization contributes to the regulation of CXCR4-mediated signaling pathways [6–8]. CXCL12, also known as chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), is the natural ligand of CXCR4. The CXCR4/CXCL12 complex mediates tumor growth and metastasis [8–14]. High CXCR4 expression has been associated with poor prognosis in several malignant tumors [15–18] including mesenchymal neoplasms [19–22].

Additional research shows that CXCR4 is overexpressed in cancer stem cells in various tumors, driving a more tumorigenic phenotype [23–25]. These cells have been identified in many mesenchymal tumors [26–29]. Cancer stem cells may contribute to treatment resistance and cancer relapse due to their ability to self-renew and switch to a quiescent state [30]. To improve conventional cancer treatments, therapeutic approaches targeting the CXCR4 chemokine receptor such as small molecules, peptidic antagonists, and monoclonal antibodies are currently under development [31]. CXCR4-targeted nanoparticles are also under investigation in several cancer types [32–35]. Since 2012, our oncogenesis and antitumor drugs research group has been developing a therapeutic nanoparticle for CXCR4-targeted drug delivery. This is currently being tested in several CXCR4-overexpressing cancer types, and preclinical results are encouraging [36–40].

Strong predictive and prognostic factors are lacking in STSs. Several studies that have focused on the identification of molecular biomarkers in STSs have led to the development of transcriptomic signatures [41–43]. These signatures are awaiting validation in prospective trials. However, continued investigation into additional and more informative biomarkers is needed. Aware that CXCR4 could be a valuable prognostic factor in cancer [15–19] and a therapeutic target [44,45], it has been hypothesized that CXCR4 expression could be a useful tool to help decision-making in patients with high-risk soft tissue tumors [19,46]. In a well-defined cohort of high-risk STSs patients, we determined CXCR4 nuclear and cytoplasmatic expression in serial samples including initial biopsies, tumors post-neoadjuvant surgical treatment, and tumors after relapse. Based on this comprehensive approach, our objective was to study whether CXCR4 could be useful to detect patients at high risk of relapse or death, and to predict sensitivity to neoadjuvant systemic treatment.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Forty-eight patients with STSs of the extremity or trunk and treated with neoadjuvant chemotherapy (anthracyclines and/or ifosfamide) or chemoradiotherapy were recruited at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau between January 2006 and March 2021. The archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue samples available for the study were 30 initial biopsies, 41 post-neoadjuvant treatment tumors, and 13 post-relapse tumors.

2.2. Immunohistochemistry

Tissue microarrays (TMAs) were constructed to analyze the expression of CXCR4 by punching 3 mm diameter cylindrical tissue cores from paraffin blocks and re-embedding them into the microarrays. Two tumor samples were included into each TMA to verify antibody specificity and staining quality. Immunohistochemical staining of the TMAs was then performed in a DAKO Autostainer Link48 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) using the anti-CXCR4 antibody (1:200; Abcam, Cambridge, UK, ab124824) following the manufacturer's instructions. All TMAs were independently examined by two investigators (AG and ACV) under an optical microscope. CXCR4 expression was evaluated both in the cytoplasm (included expression in cell membrane) and in the nucleus of tumor cells. The intensity of the staining and the percentage of positive cells were used to define the immunohistochemical score (H-score). We defined a dichotomous variable considering tumors having an H-score = 0 as "negative expression" and tumors with an H-score ≥ 1 as "positive expression".

Representative pictures were taken using an Olympus DP73 camera and processed using Olympus cellSens Entry 1.18 software (Olympus, Tokyo, Japan).

2.3. Statistics

Recurrence-free survival (RFS) was defined as the date of starting neoadjuvant chemotherapy until the date of local or distant recurrence, whichever occurred first. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis (biopsy) to date of death from any cause or last clinical follow-up. We used Kaplan–Meier curves and a log-rank test for OS and RFS analyses. Cox-regression was applied for the multivariate analyses. Survival analyses for age at diagnosis (<60 years versus ≥60 years), sex, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) (1–2 versus 0), chemotherapy regimen (anthracyclines plus ifosfamide versus high dose ifosfamide) and neoadjuvant radiotherapy were performed. The statistically significant clinicopathological variables were included as covariables in the multivariate analyses. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics (version 26.0).

3. Results

3.1. Clinical Results

Baseline characteristics of the patients and tumors are shown in Table 1. Median OS was 65.2 (range 38.0–92.4) months, and median RFS was 30.1 (range 21.1–39.1) months. Thirty patients (62.5%) relapsed and 26 died (54.2%) during follow-up. The analyses of the clinicopathological variables that, according to existing knowledge, would influence survival in STSs patients treated with neoadjuvant chemotherapy showed that ECOG PS and age were significantly associated with OS. Patients with an ECOG PS of 1–2 showed worse survival than patients who had ECOG PS 0 [39.4 months (95% CI: 10.5–68.2) versus not reached; $p = 0.035$]. Patients under 60 years of age had a median OS of 113 [95% CI: not applicable (NA)] months, whereas patients aged 60 or over had a median OS of 24.6 (95% CI: 0.0–50.7) months ($p = 0.004$). These variants were included in the multivariate analyses for OS. As none of the clinicopathological variables analyzed showed statistically significant associations with RFS, multivariate analyses for RFS were not performed.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of high-risk patients with soft tissue sarcoma.

Patient and Tumor Characteristics	N = 48	%
Age (years)		
Median	53	
Range	20–77	
<60	34	70.8
≥60	14	29.2
Sex		
Male	30	62.5
Female	18	37.5
ECOG * Performance status		
0	15	31.3
1	17	35.4
2	1	2.0
Unknown	15	31.3
Histology		
Undifferentiated pleomorphic sarcoma	17	35.4
Synovial sarcoma	10	20.8
Spindle cell sarcoma, NOS **	9	18.8
Others	12	25.0
Chemotherapy		
Epirubicin-ifosfamide	25	52.1
High-dose ifosfamide	15	31.2
Others	8	16.7

* ECOG—Eastern Cooperative Oncology Group; ** NOS—Not-otherwise specified.

3.2. CXCR4 Expression and Localization

Figure 1 shows CXCR4 expression in some histological subtypes of STSs.

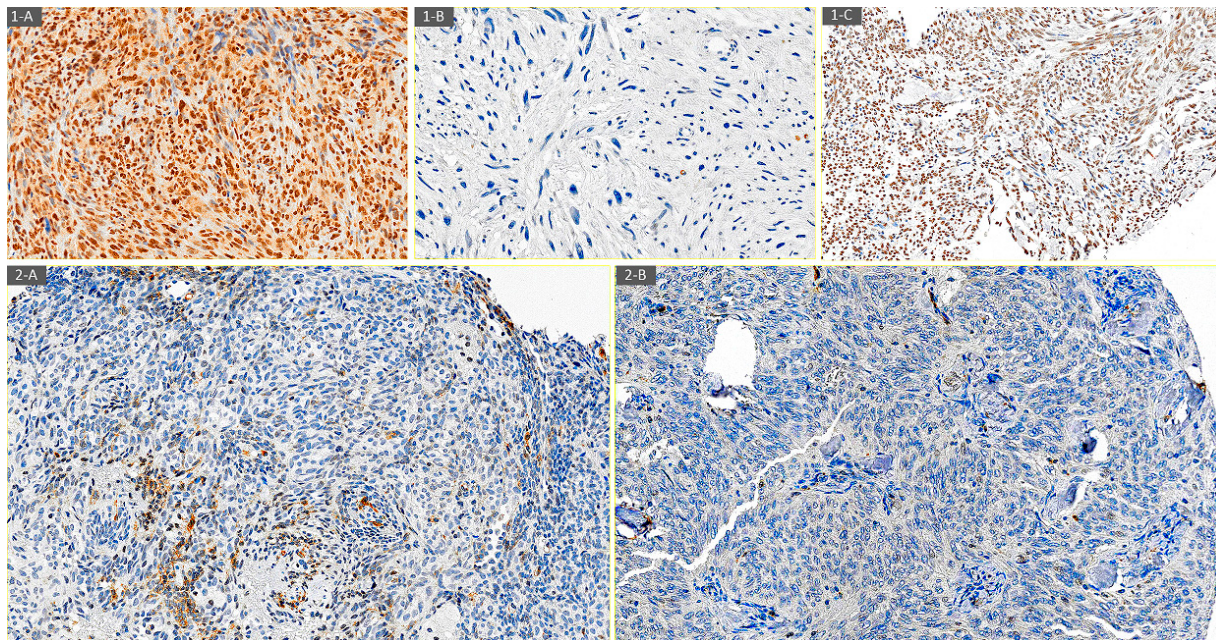


Figure 1. Examples of CXCR4 expression determined by immunohistochemistry. (1-A) CXCR4 nuclear and cytoplasmic positive immunostaining in high-grade spindle cell sarcoma (20×). (1-B) CXCR4 negative immunostaining in undifferentiated pleomorphic sarcoma (20×). (1-C) CXCR4 nuclear positive immunostaining in synovial sarcoma (20×). (2-A) CXCR4 cytoplasmic positive immunostaining in the initial biopsy of a 46-year-old woman with biphasic synovial sarcoma (20×). (2-B) CXCR4 negative immunostaining in post-neoadjuvant treatment biopsy of a 46-year-old woman with biphasic synovial sarcoma (20×).

Eighty percent (24/30) of initial biopsies had positive CXCR4 expression (11 nuclear, 6 cytoplasmic, and 7 both nuclear and cytoplasmic). In surgical samples after neoadjuvant treatment, CXCR4 positivity was 49% (20/41) (5 nuclear, 14 cytoplasmic, and 1 both nuclear and cytoplasmic). Fifty-four percent (7/13) of tumors after relapse were positive for CXCR4 (2 nuclear and 5 cytoplasmic) (Figure 2). Our data showed that the predominant localization pattern of CXCR4 expression in the initial biopsies was nuclear, whereas in the post-neoadjuvant treatment tumors, it was cytoplasmic. These differences, however, were not statistically significant. No specific pattern of CXCR4 expression was detected among the various histological subtypes of STSs or according to the treatment received.

3.3. CXCR4 in the Cohort

Numerical differences were found in RFS and OS according to CXCR4 cytoplasmic expression in post-neoadjuvant treatment tumors, but they did not reach statistical significance. Five-year RFS was 20% for patients with positive CXCR4 cytoplasmic expression compared to 46% for patients with negative cytoplasmic expression ($p = 0.1$). The 5-year OS was 30% for patients with cytoplasmic CXCR4-positive expression compared to 63% for patients with CXCR4-negative expression ($p = 0.06$) (Figure 3).

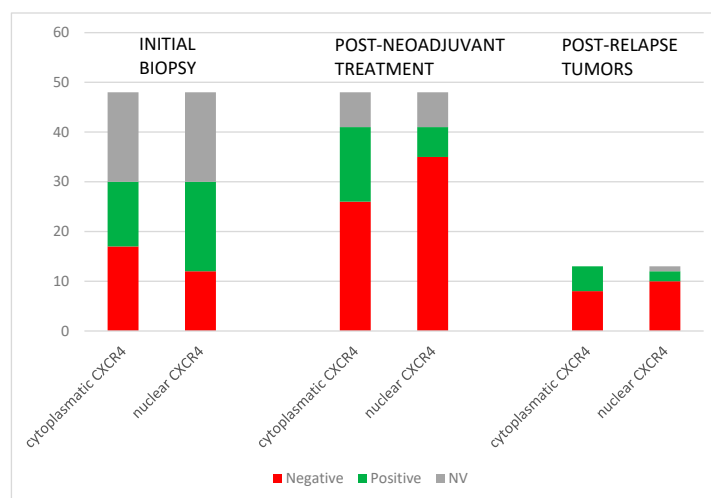


Figure 2. CXCR4 expression in the evolution of the STSs tumors: before and after neoadjuvant treatment and post-relapse.

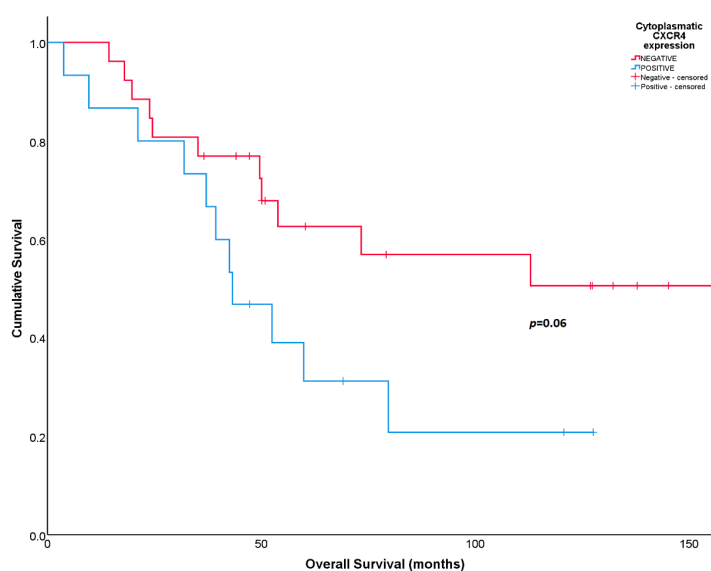


Figure 3. Overall survival according to cytoplasmic CXCR4 expression in post-neoadjuvant surgical samples.

When analyzing tumors at relapse, nuclear CXCR4 expression predicted shorter OS, although the number of samples was scarce. During the follow-up period, both patients with CXCR4-positive expression (2/2) and 70% (7/10) of patients with CXCR4-negative expression died [18 months (95% CI: NA) in positive CXCR4 versus 53.9 months (95% CI: 17.12–90.68) in negative CXCR4; $p = 0.017$]. Inversely, positive cytoplasmic CXCR4 expression was associated with higher OS. Sixty percent (3/5) of patients with CXCR4-positive expression, and 88% (7/8) with CXCR4-negative expression died [113 months (95% CI: 27.95–198.02) in positive CXCR4 versus 39.4 months (95% CI: 29.20–49.56) in negative CXCR4; $p = 0.039$].

In the multivariate analyses, none of the associations observed with OS retained statistical significance after adjusting for the clinicopathological covariates.

3.4. CXCR4 in Synovial Sarcomas

Patients with synovial sarcomas ($N = 9$) that expressed cytoplasmic CXCR4 in surgical biopsies after neoadjuvant treatment showed unfavorable RFS [17.3 months (95% CI: 7.22–27.40) in positive CXCR4 versus not reached in negative CXCR4; $p = 0.003$] (Figure 4A). At 5 years, all patients with cytoplasmic CXCR4-positive expression relapsed compared to a RFS rate of 80% for patients with CXCR4-negative expression. The same association was observed for OS; positive cytoplasmic CXCR4 expression predicted shorter survival [42.6 months (95% CI: 31.47–53.64) in positive CXCR4 versus not reached in negative CXCR4; $p = 0.019$] (Figure 4B). At 5 years follow-up, all CXCR4-positive patients and 75% of CXCR4-negative patients died.

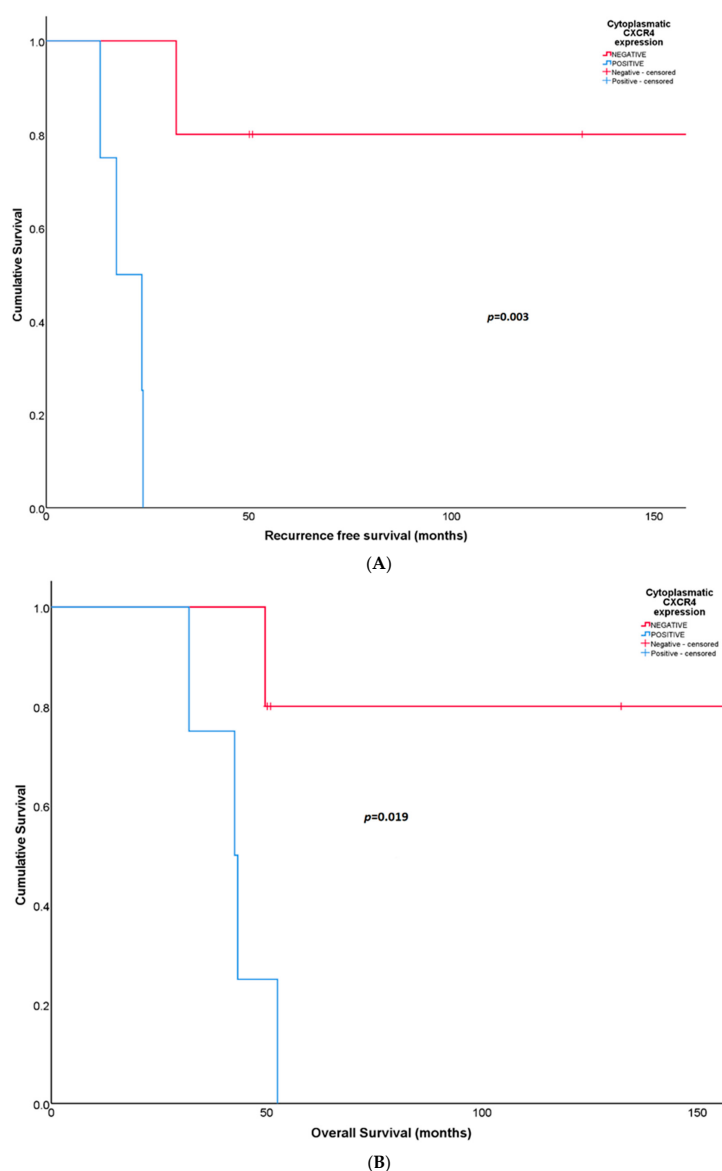


Figure 4. (A) Recurrence-free survival according to cytoplasmic CXCR4 expression in post-neoadjuvant surgical samples from patients with synovial sarcoma. (B) Overall survival according to cytoplasmic CXCR4 expression in post-neoadjuvant surgical samples obtained from patients with synovial sarcoma.

No statistically significant associations were observed between nuclear CXCR4 expression after neoadjuvant chemotherapy and survival.

3.5. CXCR4 in Undifferentiated Pleomorphic Sarcomas (UPS)

Statistically significant differences in RFS were found according to the nuclear CXCR4 expression in initial biopsies in patients with UPS ($N = 12$). Patients whose tumors expressed CXCR4 in the cell nucleus at diagnosis showed worse RFS than patients whose tumors did not express the protein [9.2 months (95% CI: 4.40–14.10) versus 20.1 months (95% CI: 5.51–34.62), respectively; $p = 0.022$] (Figure 5). This association was not observed in OS ($p = 0.3$).

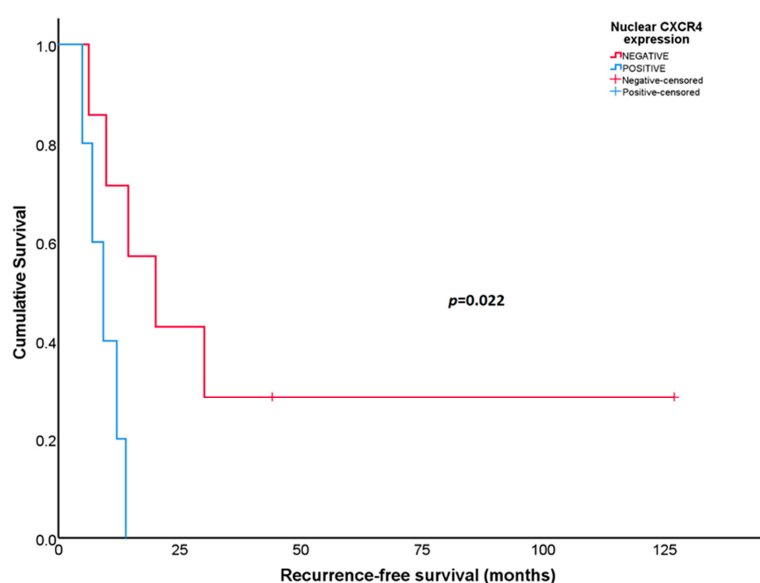


Figure 5. Recurrence-free survival according to nuclear CXCR4 expression in the initial biopsies for patients with undifferentiated pleomorphic sarcoma.

No statistically significant associations were found between cytoplasmatic CXCR4 expression at diagnosis and survival.

4. Discussion

In this study, we found that CXCR4 expression predicted poor prognosis in several histological subtypes of STSs. In synovial sarcomas in the post-neoadjuvant setting, we observed that cytoplasmic CXCR4 was associated with survival. Additionally, nuclear CXCR4 expression was associated with RFS in the initial biopsies in UPS.

Previous studies have shown that CXCR4 correlates with the expression of the angiogenic factor VEGF in STSs [22,47], and that the CXCR4/CXCL12 complex may participate in tumor dissemination and metastasis in rhabdomyosarcoma cell lines [10,12]. In synovial sarcoma, cancer stem cells expressing CXCR4 have been shown to have tumor initiation and self-renewal capacity [29]. Oda et al. [22] reported that CXCR4 expression was associated with tumor site and tumor necrosis, and that CXCR4 overexpression and high stage could be prognostic factors in malignant non-round cell tumors. These results were in line with associations described between high CXCR4 expression and poor outcome in patients with rhabdomyosarcoma [21] and synovial sarcoma [29,48], and in a 12-study meta-analysis of bone sarcomas and STSs [19].

Our results are consistent with these studies and show that cytoplasmatic CXCR4 expression after neoadjuvant treatment may be a useful biomarker to detect high-risk patients. We suggest that CXCR4 expression in the post-neoadjuvant setting could identify

tumors with cancer stem cells that are resistant to neoadjuvant treatment and may be involved in tumor relapse [49], eventually impacting survival. These observations are especially relevant in synovial sarcoma characterized by a high incidence of metastatic disease [50], and a low 5-year OS rate [3,51]. We also found an association between positive nuclear CXCR4 expression in the initial biopsy and worse RFS in patients with UPS. Thus, synovial sarcoma and UPS patients whose tumors express CXCR4 may benefit the most from the development of CXCR4-targeted therapies and/or intensive surveillance.

Another finding of interest in our study was the observation that in tumors after relapse, nuclear CXCR4 expression was associated with worse OS, while cytoplasmatic CXCR4 expression was associated with better OS. CXCR4 transfers from the cytoplasm to the nucleus after CXCL12 binding [7,52,53], and once in the nucleus, it facilitates the activation of the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) pathway [54]. Additionally, CXCR4 nuclear staining has been detected in cells of metastatic tumors [6,53]. Based on our results, we can speculate that the nuclear translocation of CXCR4 may also be relevant in the metastatic disease in STSs, and may provide additional treatment options in this late stage of the disease.

Most studies show that nuclear, cytoplasmic, or membrane CXCR4 expression correlates with poor survival, and that CXCR4 location differs by cancer type [55]. Interestingly, the diverse CXCR4 location may activate different signaling pathways, cellular responses, and cancer progression [55]. Additionally, subcellular location determines the targeted therapy approach used to ensure that it reaches its target, which would be more difficult for nuclear location [56]. Our observation of associations between CXCR4 nuclear or cytoplasmic expression and poor prognosis in STSs differs from those described between CXCR4 membrane expression and poor prognosis in epithelial cancers [55,57]. Nonetheless, these results are supported by the cellular localization of CXCR4, differing according to cell type, tumor histology, and tumor stage. Sarcomas derive from non-transformed mesenchymal stem cells [58] that express CXCR4 in the nucleus [59]. Normal epithelial cells or tissues and epithelial-derived primary tumors express CXCR4 in the membrane [60]. Metastatic carcinomas, which have undergone epithelial–mesenchymal transition, express CXCR4 in the nucleus [6,52,61].

Here, we provide evidence of the prognostic value of CXCR4 expression in tumors of patients with STSs who received neoadjuvant treatment. However, our study has some limitations. First, it involved a small number of patients due to the limited availability of FFPE for research purposes, but as far as we know, this is the first study to determine nuclear and cytoplasmatic expression of CXCR4 in serial samples. This approach allowed us to detect differences for some histological subtypes, showing its suitability in highly heterogeneous tumors such as STSs. Second, the number of patients for each histological subtype was low due to the rarity of these tumors. Nevertheless, our results provide a basis for future therapeutic strategies such as the development of CXCR4 inhibitors or CXCR4-targeted therapies and their prospective validation in clinical trials.

5. Conclusions

Our findings strengthen the importance of CXCR4 in STSs as a prognostic factor in some histological subtypes such as synovial sarcomas and UPS, suggesting a new line of research toward a therapeutic approach.

Author Contributions: All authors made substantial contributions: A.C.V., A.G. and A.S. conceptualization; A.C.V., A.L.-P., R.T. and A.S. data curation; A.G., S.B., R.O., C.F., L.A.-C. and U.U. methodology; A.C.V., A.G. and J.S. formal analysis, investigation, writing—original draft, and writing—review and editing; A.S., R.M. and I.C. writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted following the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the ethics committee of the Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau) (IIBSP-SAR-2016-102; 15 February 2017).

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

Data Availability Statement: The data presented in this study are not publicly available due to ethical committee regulations but are available on request from the corresponding authors on reasonable request.

Acknowledgments: We thank Carolyn Newey for language editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Soft Tissue and Bone Tumours WHO Classification of Tumours*, 5th ed.; IARC: Lyon, France, 2020.
2. Gronchi, A.; Miah, A.B.; Dei Tos, A.P.; Abecassis, N.; Bajpai, J.; Bauer, S.; Biagini, R.; Bielack, S.; Blay, J.Y.; Bolle, S.; et al. Soft Tissue and Visceral Sarcomas: ESMO–EURACAN–GENTURIS Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2021**, *32*, 1348–1365. [CrossRef] [PubMed]
3. Callegaro, D.; Miceli, R.; Mariani, L.; Raut, C.P.; Gronchi, A. Soft Tissue Sarcoma Nomograms and Their Incorporation into Practice. *Cancer* **2017**, *123*, 2802–2820. [CrossRef] [PubMed]
4. Baldini, E.H.; Le Cesne, A.; Trent, J.C. Neoadjuvant Chemotherapy, Concurrent Chemoradiation, and Adjuvant Chemotherapy for High-Risk Extremity Soft Tissue Sarcoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2018**, *38*, 910–915. [CrossRef] [PubMed]
5. Casali, P.G.; Abecassis, N.; Bauer, S.; Biagini, R.; Bielack, S.; Bonvalot, S.; Boukovinas, I.; Bovee, J.V.M.G.; Brodowicz, T.; Broto, J.M.; et al. Soft Tissue and Visceral Sarcomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, iv51–iv67. [CrossRef]
6. Don-Salu-Hewage, A.S.; Chan, S.Y.; McAndrews, K.M.; Chetram, M.A.; Dawson, M.R.; Bethea, D.A.; Hinton, C.V. Cysteine (C)-X-C Receptor 4 Undergoes Transportin 1-Dependent Nuclear Localization and Remains Functional at the Nucleus of Metastatic Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57194. [CrossRef] [PubMed]
7. Xu, Z.; Li, P.; Wei, D.; Wang, Z.; Bao, Y.; Sun, J.; Qu, L.; Wang, L. NMMHC-IIA-Dependent Nuclear Location of CXCR4 Promotes Migration and Invasion in Renal Cell Carcinoma. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 2681–2688. [CrossRef] [PubMed]
8. Saba, N.F.; Wang, Y.; Fu, H.; Koenig, L.; Khuri, F.R.; Shin, D.M.; Chen, Z.G. Association of Cytoplasmic CXCR4 With Loss of Epithelial Marker and Activation of ERK1/2 and AKT Signaling Pathways in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* **2017**, *18*, e203–e210. [CrossRef] [PubMed]
9. Vila-Coro, A.J.; Rodríguez-Frade, J.M.; De Ana, A.M.; Moreno-Ortiz, M.C.; Martínez, A.C.; Mellado, M. The Chemokine SDF-1 α Triggers CXCR4 Receptor Dimerization and Activates the JAK/STAT Pathway. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10506573/> (accessed on 13 March 2023).
10. Libura, J.; Drukala, J.; Majka, M.; Tomescu, O.; Navenot, J.M.; Kucia, M.; Marquez, L.; Peiper, S.C.; Barr, F.G.; Janowska-Wieczorek, A.; et al. CXCR4-SDF-1 Signaling Is Active in Rhabdomyosarcoma Cells and Regulates Locomotion, Chemotaxis, and Adhesion. *Blood* **2002**, *100*, 2597–2606. [CrossRef] [PubMed]
11. Barbero, S.; Bonavia, R.; Bajetto, A.; Porcile, C.; Pirani, P.; Ravetti, J.L.; Zona, G.L.; Spaziante, R.; Florio, T.; Schettini, G. Stromal Cell-Derived Factor 1 α Stimulates Human Glioblastoma Cell Growth through the Activation of Both Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 and Akt. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12702590/> (accessed on 13 March 2023).
12. Strahm, B.; Durbin, A.D.; Sexsmith, E.; Malkin, D. The CXCR4-SDF1 α Axis Is a Critical Mediator of Rhabdomyosarcoma Metastatic Signaling Induced by Bone Marrow Stroma. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *25*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
13. Porcile, C.; Bajetto, A.; Barbieri, F.; Barbero, S.; Bonavia, R.; Biglieri, M.; Pirani, P.; Florio, T.; Schettini, G. Stromal Cell-Derived Factor-1 α (SDF-1 α /CXCL12) Stimulates Ovarian Cancer Cell Growth through the EGF Receptor Transactivation. *Exp. Cell Res.* **2005**, *308*, 241–253. [CrossRef]
14. Ieranò, C.; Santagata, S.; Napolitano, M.; Guardia, F.; Grimaldi, A.; Antignani, E.; Botti, G.; Consales, C.; Riccio, A.; Nanayakkara, M.; et al. CXCR4 and CXCR7 Transduce through MTOR in Human Renal Cancer Cells. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1310. [CrossRef] [PubMed]
15. Qiu, L.; Xu, Y.; Xu, H.; Yu, B. The Clinicopathological and Prognostic Value of CXCR4 Expression in Patients with Lung Cancer: A Meta-Analysis. *BMC Cancer* **2022**, *22*, 681. [CrossRef]
16. Lv, S.; Yang, Y.; Kwon, S.; Han, M.; Zhao, F.; Kang, H.; Dai, C.; Wang, R. The Association of CXCR4 Expression with Prognosis and Clinicopathological Indicators in Colorectal Carcinoma Patients: A Meta-Analysis. *Histopathology* **2014**, *64*, 701–712. [CrossRef] [PubMed]
17. Liu, C.F.; Liu, S.Y.; Min, X.Y.; Ji, Y.Y.; Wang, N.; Liu, D.; Ma, N.; Li, Z.F.; Li, K. The Prognostic Value of CXCR4 in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92629. [CrossRef] [PubMed]
18. Si, X.; Ma, J.; Yu, F.; Zhao, H.; Huang, H.; Sun, Y.W. Clinicopathological and Prognostic Significance of CXCR4 High Expression in Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis and Literature Review. *Int. J. Surg.* **2019**, *71*, 12–18. [CrossRef] [PubMed]

19. Li, Y.J.; Dai, Y.L.; Zhang, W.B.; Li, S.J.; Tu, C.Q. Clinicopathological and Prognostic Significance of Chemokine Receptor CXCR4 in Patients with Bone and Soft Tissue Sarcoma: A Meta-Analysis. *Clin. Exp. Med.* **2017**, *17*, 59–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Laverdiere, C.; Hoang, B.H.; Yang, R.; Sowers, R.; Qin, J.; Meyers, P.A.; Huvos, A.G.; Healey, J.H.; Gorlick, R. Messenger RNA Expression Levels of CXCR4 Correlate with Metastatic Behavior and Outcome in Patients with Osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2561–2567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Diomedì-Camassei, F.; McDowell, H.P.; De Ioris, M.A.; Uccini, S.; Altavista, P.; Raschella, G.; Vitali, R.; Mannarino, O.; De Sio, L.; Cozzi, D.A.; et al. Clinical Significance of CXCR4 Chemokine Receptor-4 and c-Met in Childhood Rhabdomyosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4119–4127. [\[CrossRef\]](#)
22. Oda, Y.; Tateishi, N.; Matono, H.; Matsuuura, S.; Yamamoto, H.; Tamiya, S.; Yokoyama, R.; Matsuda, S.; Iwamoto, Y.; Tsuneyoshi, M. Chemokine Receptor CXCR4 Expression Is Correlated with VEGF Expression and Poor Survival in Soft-Tissue Sarcoma. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 1852–1859. [\[CrossRef\]](#)
23. Dubrovskaya, A.; Elliott, J.; Salamone, R.J.; Telegeev, G.D.; Stakhovsky, A.E.; Schepotin, I.B.; Yan, F.; Wang, Y.; Bouchez, L.C.; Kularatne, S.A.; et al. CXCR4 Expression in Prostate Cancer Progenitor Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31226. [\[CrossRef\]](#)
24. Gassenmaier, M.; Chen, D.; Buchner, A.; Henkel, L.; Schiemann, M.; Mack, B.; Schendel, D.J.; Zimmermann, W.; Pohla, H. CXCR4 Chemokine Receptor 4 Is Essential for Maintenance of Renal Cell Carcinoma-Initiating Cells and Predicts Metastasis. *Stem Cells* **2013**, *31*, 1467–1476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Jung, M.J.; Rho, J.K.; Kim, Y.M.; Jung, J.E.; Jin, Y.B.; Ko, Y.G.; Lee, J.S.; Lee, S.J.; Lee, J.C.; Park, M.J. Upregulation of CXCR4 Is Functionally Crucial for Maintenance of Stemness in Drug-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Oncogene* **2013**, *32*, 209–221. [\[CrossRef\]](#)
26. Suvà, M.L.; Riggi, N.; Stehle, J.C.; Baumer, K.; Tercier, S.; Joseph, J.M.; Suvà, D.; Clément, V.; Provero, P.; Cironi, L.; et al. Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1776–1781. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Hirotsu, M.; Setoguchi, T.; Matsunoshita, Y.; Sasaki, H.; Nagao, H.; Gao, H.; Sugimura, K.; Komiya, S. Tumour Formation by Single Fibroblast Growth Factor Receptor 3-Positive Rhabdomyosarcoma-Initiating Cells. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 2030–2037. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Tirino, V.; Desiderio, V.; Paino, F.; De Rosa, A.; Papaccio, F.; Fazioli, F.; Pirozzi, G.; Papaccio, G. Human Primary Bone Sarcomas Contain CD133 + Cancer Stem Cells Displaying High Tumorigenicity In Vivo. *FASEB J.* **2011**, *25*, 2022–2030. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Kimura, T.; Wang, L.; Tabu, K.; Tsuda, M.; Tanino, M.; Maekawa, A.; Nishihara, H.; Hiraga, H.; Taga, T.; Oda, Y.; et al. Identification and Analysis of CXCR4-Positive Synovial Sarcoma-Initiating Cells. *Oncogene* **2016**, *35*, 3932–3943. [\[CrossRef\]](#)
30. Paul, R.; Dorsey, J.F.; Fan, Y. Cell Plasticity, Senescence, and Quiescence in Cancer Stem Cells: Biological and Therapeutic Implications. *Pharmacol. Ther.* **2022**, *231*, 107985. [\[CrossRef\]](#)
31. Nengroo, M.A.; Khan, M.A.; Verma, A.; Datta, D. Demystifying the CXCR4 Conundrum in Cancer Biology: Beyond the Surface Signaling Paradigm. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer* **2022**, *1877*, 188790. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Medina-Gutiérrez, E.; Céspedes, M.V.; Gallardo, A.; Rioja-Blanco, E.; Pavón, M.Á.; Asensio-Puig, L.; Farré, L.; Alba-Castellón, L.; Unzueta, U.; Villaverde, A.; et al. Novel Endometrial Cancer Models Using Sensitive Metastasis Tracing for CXCR4-Targeted Therapy in Advanced Disease. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1680. [\[CrossRef\]](#)
33. Sala, R.; Rioja-Blanco, E.; Serna, N.; Sánchez-García, L.; Álamo, P.; Alba-Castellón, L.; Casanova, I.; López-Pousa, A.; Unzueta, U.; Céspedes, M.V.; et al. GSDMD-Dependent Pyroptotic Induction by a Multivalent CXCR4-Targeted Nanotoxin Blocks Colorectal Cancer Metastases. *Drug Deliv.* **2022**, *29*, 1384–1397. [\[CrossRef\]](#)
34. Rioja-Blanco, E.; Arroyo-Solera, I.; Álamo, P.; Casanova, I.; Gallardo, A.; Unzueta, U.; Serna, N.; Sánchez-García, L.; Quer, M.; Villaverde, A.; et al. Self-Assembling Protein Nanocarrier for Selective Delivery of Cytotoxic Polypeptides to CXCR4+ Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumors. *Acta Pharm. Sin. B* **2022**, *12*, 2578–2591. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Pallarès, V.; Unzueta, U.; Falgàs, A.; Sánchez-García, L.; Serna, N.; Gallardo, A.; Morris, G.A.; Alba-Castellón, L.; Álamo, P.; Sierra, J.; et al. An Auristatin Nanoconjugate Targeting CXCR4+ Leukemic Cells Blocks Acute Myeloid Leukemia Dissemination. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *13*, 36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Unzueta, U.; Céspedes, M.V.; Ferrer-Miralles, N.; Casanova, I.; Cedano, J.; Corchero, J.L.; Domingo-Espín, J.; Villaverde, A.; Mangues, R.; Vázquez, E. Intracellular CXCR4+ Cell Targeting with T22-Empowered Protein-Only Nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 4533–4544. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Sala, R.; Sánchez-García, L.; Serna, N.; Céspedes, M.V.; Casanova, I.; Roldán, M.; Sánchez-Chardi, A.; Unzueta, U.; Vázquez, E.; Mangues, R.; et al. Collaborative Membrane Activity and Receptor-Dependent Tumor Cell Targeting for Precise Nanoparticle Delivery in CXCR4+ Colorectal Cancer. *Acta Biomater.* **2019**, *99*, 426–432. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Falgàs, A.; Pallarès, V.; Unzueta, U.; Céspedes, M.V.; Arroyo-Solera, I.; Moreno, M.J.; Gallardo, A.; Mangues, M.A.; Sierra, J.; Villaverde, A.; et al. A CXCR4-Targeted Nanocarrier Achieves Highly Selective Tumor Uptake in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Mouse Models. *Haematologica* **2020**, *105*, 741–753. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Rioja-Blanco, E.; Gallardo, A.; Arroyo-Solera, I.; Álamo, P.; Casanova, I.; Unzueta, U.; Serna, N.; Sánchez-García, L.; Quer, M.; Villaverde, A.; et al. A Novel CXCR4-Targeted Diphtheria Toxin Nanoparticle Inhibits Invasion and Metastatic Dissemination in a Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Mouse Model. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 887. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Medina-Gutiérrez, E.; García-León, A.; Gallardo, A.; Álamo, P.; Alba-Castellón, L.; Unzueta, U.; Villaverde, A.; Vázquez, E.; Casanova, I.; Mangues, R. Potent Anticancer Activity of CXCR4-Targeted Nanostructured Toxins in Aggressive Endometrial Cancer Models. *Cancers* **2023**, *15*, 85. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

41. Merry, E.; Thway, K.; Jones, R.L.; Huang, P.H. Predictive and Prognostic Transcriptomic Biomarkers in Soft Tissue Sarcomas. *NPJ Precis. Oncol.* **2021**, *5*, 17. [CrossRef] [PubMed]
42. Francis, P.; Namløs, H.M.; Müller, C.; Edén, P.; Fernebro, J.; Berner, J.M.; Bjerkehaugen, B.; Åkerman, M.; Bendahl, P.O.; Isinger, A.; et al. Diagnostic and Prognostic Gene Expression Signatures in 177 Soft Tissue Sarcomas: Hypoxia-Induced Transcription Profile Signifies Metastatic Potential. *BMC Genom.* **2007**, *8*, 73. [CrossRef]
43. Abeshouse, A.; Adebamowo, C.; Adebamowo, S.N.; Akbani, R.; Akeredolu, T.; Ally, A.; Anderson, M.L.; Anur, P.; Appelbaum, E.L.; Armenia, J.; et al. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell* **2017**, *171*, 950–965.e28. [CrossRef]
44. Vela, M.; Bueno, D.; González-Navarro, P.; Brito, A.; Fernández, L.; Escudero, A.; Valentín, J.; Mestre-Durán, C.; Arranz-álvarez, M.; de Diego, R.P.; et al. Anti-CXCR4 Antibody Combined with Activated and Expanded Natural Killer Cells for Sarcoma Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1814. [CrossRef]
45. Liao, Y.X.; Lv, J.Y.; Zhou, Z.F.; Xu, T.Y.; Yang, D.; Gao, Q.M.; Fan, L.; Li, G.D.; Yu, H.Y.; Liu, K.Y. CXCR4 Blockade Sensitizes Osteosarcoma to Doxorubicin by Inducing Autophagic Cell Death via PI3K-Akt-MTOR Pathway Inhibition. *Int. J. Oncol.* **2021**, *59*, 49. [CrossRef]
46. Kim, R.H.; Li, B.D.L.; Chu, Q.D. The Role of Chemokine Receptor CXCR4 in the Biologic Behavior of Human Soft Tissue Sarcoma. *Sarcoma* **2011**, *2011*, 593708. [CrossRef]
47. Miyoshi, K.; Kohashi, K.; Fushimi, F.; Yamamoto, H.; Kishimoto, J.; Taguchi, T.; Iwamoto, Y.; Oda, Y. Close Correlation between CXCR4 and VEGF Expression and Frequent CXCR7 Expression in Rhabdomyosarcoma. *Hum. Pathol.* **2014**, *45*, 1900–1909. [CrossRef]
48. Palmerini, E.; Benassi, M.S.; Quattrini, I.; Pazzaglia, L.; Donati, D.; Benini, S.; Gamberi, G.; Gambarotti, M.; Picci, P.; Ferrari, S. Prognostic and Predictive Role of CXCR4, IGF-1R and Ezrin Expression in Localized Synovial Sarcoma: Is Chemotaxis Important to Tumor Response? *Orphanet J. Rare Dis.* **2015**, *10*, 6. [CrossRef]
49. Nassar, D.; Blanpain, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2016**, *11*, 47–76. [CrossRef]
50. Krieg, A.H.; Hefti, F.; Speth, B.M.; Jundt, G.; Guillou, L.; Exner, U.G.; von Hochstetter, A.R.; Cserhati, M.D.; Fuchs, B.; Mouhsine, E.; et al. Synovial Sarcomas Usually Metastasize after >5 Years: A Multicenter Retrospective Analysis with Minimum Follow-up of 10 Years for Survivors. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 458–467. [CrossRef]
51. Aytekin, M.N.; Öztürk, R.; Amer, K.; Yapar, A. Epidemiology, Incidence, and Survival of Synovial Sarcoma Subtypes: SEER Database Analysis. *J. Orthop. Surg.* **2020**, *28*, 2309499020936009. [CrossRef]
52. Wang, L.; Wang, Z.; Yang, B.; Yang, Q.; Wang, L.; Sun, Y. CXCR4 Nuclear Localization Follows Binding of Its Ligand SDF-1 and Occurs in Metastatic but Not Primary Renal Cell Carcinoma. *Oncol. Rep.* **2009**, *22*, 1333–1339. [CrossRef]
53. Wang, L.H.; Liu, Q.; Xu, B.; Chen, W.; Yang, Q.; Wang, Z.X.; Sun, Y.H. Identification of Nuclear Localization Sequence of CXCR4 in Renal Cell Carcinoma by Constructing Expression Plasmids of Different Deletants. *Plasmid* **2010**, *63*, 68–72. [CrossRef]
54. Bao, Y.; Wang, Z.; Liu, B.; Lu, X.; Xiong, Y.; Shi, J.; Li, P.; Chen, J.; Zhang, Z.; Chen, M.; et al. A Feed-Forward Loop between Nuclear Translocation of CXCR4 and HIF-1 α Promotes Renal Cell Carcinoma Metastasis. *Oncogene* **2019**, *38*, 881–895. [CrossRef]
55. Guo, F.; Wang, Y.; Liu, J.; Mok, S.C.; Xue, F.; Zhang, W. CXCL12/CXCR4: A Symbiotic Bridge Linking Cancer Cells and Their Stromal Neighbors in Oncogenic Communication Networks. *Oncogene* **2016**, *35*, 816–826. [CrossRef]
56. Heuninck, J.; Viciano, C.P.; İşbilir, A.; Caspar, B.; Capoferri, D.; Briddon, S.J.; Durroux, T.; Hill, S.J.; Lohse, M.J.; Milligan, G.; et al. Context-Dependent Signaling of CXCR4 and Atypical Chemokine Receptor 3. *Mol. Pharmacol.* **2019**, *96*, 778–793. [CrossRef]
57. Chatterjee, S.; Behnam Azad, B.; Nimmagadda, S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *124*, 31–82. [CrossRef] [PubMed]
58. Damerell, V.; Pepper, M.S.; Prince, S. Molecular Mechanisms Underpinning Sarcomas and Implications for Current and Future Therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 246. [CrossRef]
59. Pelekanos, R.A.; Ting, M.J.; Sardesai, V.S.; Ryan, J.M.; Lim, Y.C.; Chan, J.K.Y.; Fisk, N.M. Intracellular Trafficking and Endocytosis of CXCR4 in Fetal Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *BMC Cell Biol.* **2014**, *15*, 15. [CrossRef]
60. The Human Protein Atlas. 2023. Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000121966-CXCR4> (accessed on 9 June 2023).
61. Speetjens, F.M.; Liefers, G.J.; Korbee, C.J.; Mesker, W.E.; Van De Velde, C.J.H.; Van Vlierberghe, R.L.; Morreau, H.; Tollenaar, R.A.; Kuppen, P.J.K. Nuclear Localization of CXCR4 Determines Prognosis for Colorectal Cancer Patients. *Cancer Microenviron.* **2009**, *2*, 1–7. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

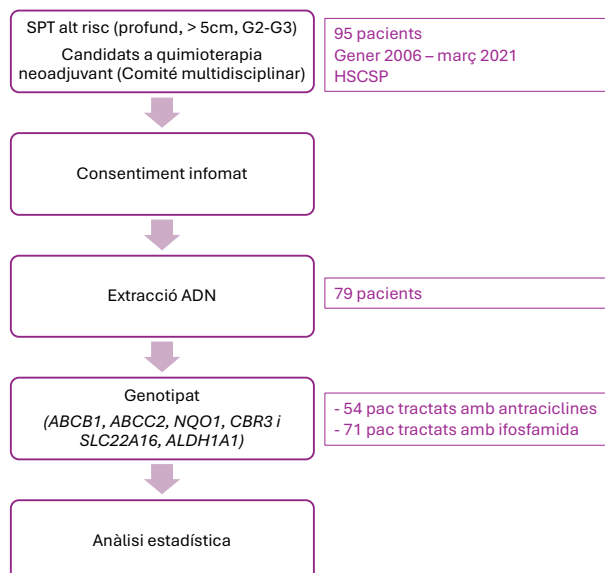
5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

L'objectiu del primer treball de la present tesi doctoral va ser la recerca de biomarcadors predictors de benefici de la quimioteràpia neoadjuvant. Es van analitzar polimorfismes de gens implicats en el metabolisme dels fàrmacs utilitzats en el tractament neoadjuvant de SPT localitzats i es van relacionar amb la toxicitat, la resposta i la supervivència.

Es van incloure a l'estudi 95 pacients amb diagnòstic de SPT localitzat tractats amb QT neoadjuvant al HSCSP entre el gener del 2006 i el març del 2021. Després d'obtenir el consentiment informat, es van recollir les dades clíniques i es va extreure ADN a partir de sang perifèrica o, si no era possible, de mostres de teixit tumoral en parafina. Finalment, es van analitzar les dades de 79 pacients dels quals es disposava de dades clíniques i genètiques. D'aquests pacients, 54 havien rebut antraciclins (epirubicina o doxorubicina) i 71 pacients ifosfamida en monoteràpia o en combinació amb epirubicina dins dels esquemes de neoadjuvència.

A partir d'una recerca bibliogràfica de variants genètiques amb evidència reportada en estudis d'associació, es van seleccionar 10 SNPs en 5 gens involucrats en el metabolisme de les antraciclins (*ABCB1*, *ABCC2*, *NQO1*, *CBR3* i *SLC22A16*) i 2 SNPs del gen *ALDH1A1*, involucrat en el catabolisme de la ifosfamida.

Figura 10. Diagrama de flux dels pacients inclosos a l'estudi



En les anàlisis estadístiques realitzades a partir de les dades dels pacients tractats amb antraciclins, es van trobar associacions significatives amb la toxicitat i la supervivència en els dos SNPs del gen *ABCC2* analitzats.

La variant *ABCC2* rs3740066 (c.3972 C>T) es va associar amb el risc de toxicitat hematològica. Els pacients homozigots per l'al·lel minoritari (genotip TT) van presentar amb més freqüència neutropènia febril ($p=0.04$ a l'anàlisi univariat i $p=0.031$ en el multivariat, ajustat per sexe, edat i tractament de RT). Així mateix, aquest mateix SNP es va veure relacionat amb el pronòstic; la SG mediana dels pacients amb genotip TT va ser significativament inferior (HR 4.4, IC 95% 1.21-16.31; $p=0.014$) a la de la resta de pacients. Aquesta significació es va mantenir en l'estudi multivariat (HR 5.4, IC 95% 1.2-22.9; $p=0.024$).

Per l'altra variant analitzada a aquest gen, l'*ABCC2* rs2272697 (c.1249 G>A), els pacients homozigots GG van presentar una freqüència més elevada, tot i que no significativa, de neutropènia febril. Amb aquesta observació es va plantejar l'estudi d'haplotips (rs3740066|rs2272697) i es va veure que l'haplotip TG es relacionava amb un risc significativament superior de neutropènia febril ($p=0.04$).

La variant *ABCC2* rs2273697 també es va veure associada amb la supervivència: els pacients amb genotip AA van presentar una pitjor supervivència en termes de SLR ($p=0.042$ en l'anàlisi univariat i $p=0.024$ en el multivariat).

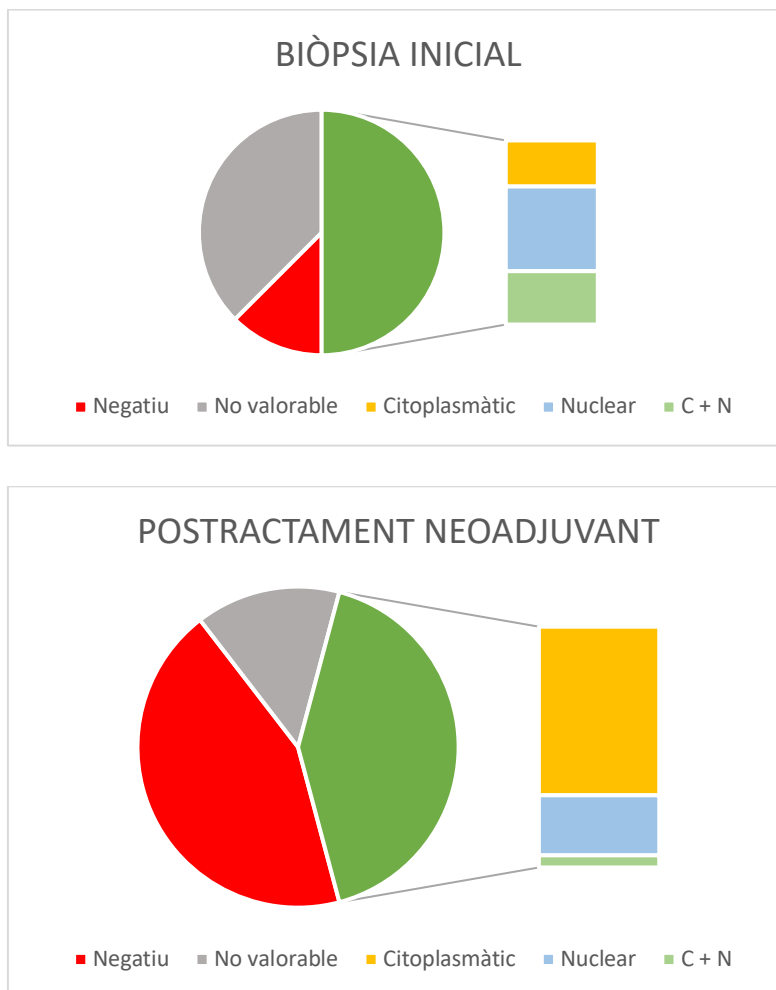
Les variants analitzades d'*ABCB1* no van mostrar en l'estudi individual diferències significatives en toxicitat ni en supervivència. Tanmateix, a l'estudi d'haplotips (rs1128503|rs2032582|rs1045642) es va veure que els pacients amb l'haplotip TGT tenien més anèmia graus 3-4 a l'estudi multivariat ($p=0.02$). Aquest mateix haplotip es va relacionar amb SLR i SG a l'estudi multivariat ($p=0.001$ i $p<0.001$ respectivament).

Dels 71 pacients que van ser tractats amb esquemes que incloïen ifosfamida, 68 van ser vàlids per l'anàlisi de supervivència. Els resultats van mostrar que, per la variant *ALDH1A1* rs3764435 (c.1434-680 A>C), els pacients homozigots AA van tenir una supervivència significativament menor en termes de SLR (univariat HR 2.0, $p=0.034$; multivariat HR 2.0, $p=0.046$) i SG a 5 anys (univariat HR 2.3 $p=0.038$; multivariat $p=0.095$) que la resta de pacients.

En el segon estudi, l'objectiu va ser la recerca de biomarcadors pronòstics a la nostra cohort de pacients tractats amb quimioteràpia neoadjuvant. Es va analitzar l'expressió de CXCR4 en 48 pacients tractats amb QT neoadjuvant en tres moments de la història de la malaltia: en el diagnòstic, en la biòpsia quirúrgica postneoadjuvència i en la recaiguda. L'anàlisi de CXCR4 es va fer per tinció immunohistoquímica, valorant l'expressió citoplasmàtica i nuclear, i dicotomitant els resultats entre expressió negativa o positiva (amb un punt de tall de H-score de 1). Les anàlisis estadístiques es van realitzar en tota la mostra i en els subtipus histològics predominants (sarcoma sinovial, UPS, sarcoma fusocelular, leiomiomesarcoma).

La primera observació destacable va ser que l'expressió de CXCR4, tant citoplasmàtica com nuclear, varia en les diferents mostres. El patró d'expressió en les mostres de biòpsia pretractament va ser predominantment nuclear, mentre que en les mostres després de neoadjuvència era predominantment citoplasmàtic. Es van observar diferències en el global d'expressió de CXCR4, amb un 80% de positivitat en la biòpsia inicial i un 49% de positivitat en mostres quirúrgiques postneoadjuvència.

Figura 11. Tinció CXCR4 en les mostres de biòpsia inicial, postractament neoadjuvant i a la recaiguda



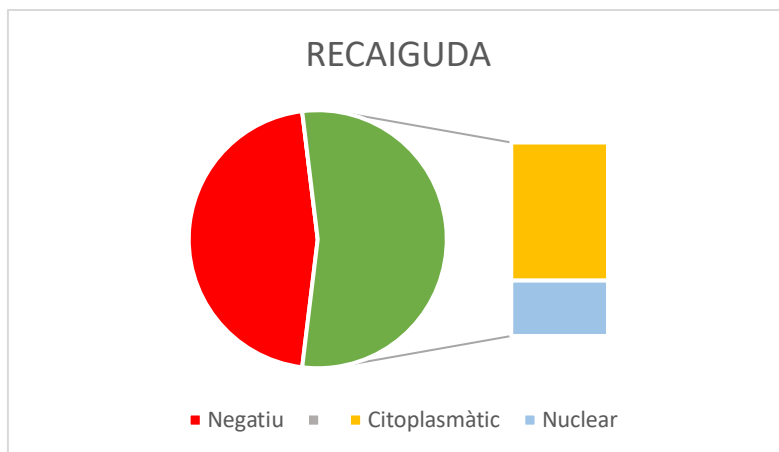
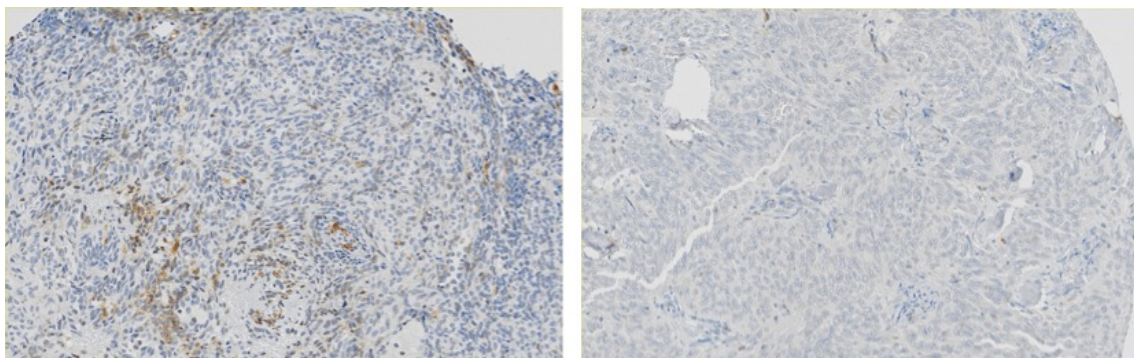


Figura 12. Exemple de pacient dona de 46 anys amb diagnòstic de sarcoma sinovial. Tinció citoplasmàtica CXCR4 inicial positiva i després de tractament neoadjuvant, negativa.



En el global de pacients no es van trobar relacions estadísticament significatives en l'expressió de CXCR4 amb SG o SLR, tot i que es van observar diferències numèriques amb una tendència a a presentar un pitjor pronòstic en els pacients amb expressió citoplasmàtica de CXCR4 en mostres postneoadjuvència. Sí que es va constatar, de manera global, que en les mostres a la recaiguda, l'expressió nuclear de CXCR4 es relacionava amb pitjor SG ($p=0.017$) i, paral·lelament, l'expressió citoplasmàtica, es relacionava amb millor supervivència ($p=0.039$) en l'anàlisi univariats.

A l'analitzar els resultats en les diferents histologies, es va observar que els pacients amb sarcomes sinovials que després de la neoadjuvència tenien una tinció citoplasmàtica positiva per CXCR4 tenien un risc de recaiguda ($p=0.003$) i mort ($p=0.019$) marcadament superior als pacients amb expressió CXCR4 negativa. Per altra banda, la tinció nuclear de CXCR4 en biòpsies inicials pretractament de sarcomes pleomòrfics indiferenciats (UPS) també es va relacionar significativament amb una SLR inferior (80% vs 0% a 5 anys $p=0.022$).

6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ

Els SPT són un grup molt heterogeni de neoplàsies malignes amb una alta taxa global de recaigudes locals i a distància i amb una alta variabilitat de sensibilitat al tractament sistèmic.

Hi ha una carència important de factors pronòstics i predictius de resposta coneguts que ens permetin ajudar a predir quins són els pacients que es poden beneficiar del tractament de quimioteràpia perioperatòria i decidir el millor tractament per cada pacient, en especial, pels pacients amb major risc de recaiguda i mort. En aquest sentit, la recerca de nous biomarcadors, ja sigui germinals o somàtics, fàcilment aplicables en la pràctica clínica habitual, és una línia de recerca imprescindible per aconseguir millors resultats clínics amb la menor toxicitat possible.

La hipòtesi de la present tesi doctoral planteja que la identificació de nous factors pronòstics i predictius de resposta i toxicitat pot contribuir a una millor selecció dels pacients amb un major benefici al tractament de quimioteràpia en una patologia com és la dels SPT amb alt risc de recaiguda i de desenvolupar toxicitats als tractaments.

Per demostrar aquesta hipòtesi, es van plantejar dos estudis en pacients diagnosticats de SPT tractats amb quimioteràpia neoadjuvant, per una banda la recerca de biomarcadors farmacogenètics pel tractament de quimioteràpia neoadjuvant i per l'altra l'estudi de CXCR4 per immunohistoquímica com a biomarcador pronòstic.

6.1. Estudi farmacogenètic

Tant les antraciclins com la ifosfamida són fàrmacs que presenten altes taxes de toxicitats greus (graus 3-4) que poden ocasionar complicacions limitants en els pacients que les reben, però no es disposen de biomarcadors validats per predir el risc d'aquestes toxicitats ni la probabilitat de resposta per tal de decidir quins pacients poden obtenir un major benefici del tractament sistèmic neoadjuvant.

En aquest context, els estudis farmacogenètics contribueixen a detectar pacients amb alt risc de toxicitat a fàrmacs. En oncologia hi ha hagut importants avenços en els últims anys en aquest camp que han permès identificar dos biomarcadors farmacogenètics predictius de toxicitat dels quals s'ha incorporat el seu estudi a la pràctica clínica. És el cas de la UDP glucoronosiltransferasa (*UGT1A1*) en la toxicitat de l'irinotecan i la dihidripirimidina deshidrogenasa (*DPYD*) en la toxicitat de fluoropirimidines.

No s'han descrit, fins al moment, marcadors farmacogenètics en SPT que ajudin a la presa de decisions quan s'ha de plantejar un tractament neoadjuvant amb antraciclins i/o ifosfamida. Sí

que hi ha bibliografia reportada en altres tumors més prevalents, com és en el càncer de mama, en el qual s'utilitzen esquemes similars de QT i que, per tant, poden ser útils com a model pel disseny d'estudis en sarcomes.

Basant-nos en aquests coneixements, vam realitzar el primer estudi, en el qual vam analitzar polimorfismes en gens relacionats amb el metabolisme de les antraciclins i la detoxificació de la ifosfamida.

Les antraciclins (en concret la doxorubicina i la epirubicina) s'utilitzen en monoteràpia o en combinació amb altres agents citotòxics pel tractament dels sarcomes. En neoadjuvència s'utilitza preferentment l'epirubicina associada a ifosfamida per tenir un millor perfil de toxicitat cardiològica (66).

Els primers resultats obtinguts destacats van ser les associacions entre variants rs3740066 i rs2273697 al gen *ABCC2* i la toxicitat i la supervivència en pacients tractats amb antraciclins. *ABCC2* és un transportador d'eflux involucrat en l'exposició a doxorubicina que juga un paper destacat en la detoxificació. Està implicat en la resistència a fàrmacs com la vincristina, la doxorubicina i el cisplatí (67).

En quant a l'associació amb la toxicitat, els nostres resultats van en línia amb els publicats per Tecza i col·laboradors en un estudi realitzat en pacients amb càncer de mama tractades amb doxorubicina, ciclofosfamida i 5-fluorouracil, on van observar que els pacients amb genotip TT per *ABCC2* rs3740066 tenien un risc superior de neutropènia (43).

En l'actualitat, disposem de poques dades referents a la funcionalitat de l'*ABCC2* rs3740066, tot i ser una variant estudiada en relació al metabolisme de diversos fàrmacs. Aquest SNP es una variant missense (C>T, Ile1324Ile) que no comporta canvi d'aminoàcid; tot i que estudis *in silico* el categoritzen amb una classificació 1d, amb una probabilitat 55% de ser funcional (68,69). D'altra banda, pot ser que l'associació observada sigui deguda al fet que aquesta variant es troba en desequilibri de lligament amb un altre SNP, *ABCC2* rs717620 (D': 0.95, r^2 : 0.40 en població Europea; dades del projecte 1000 Genomes - GRCh38), que es localitza al promotor i que s'ha associat amb una activitat promotora reduïda i amb nivells d'ARNm d'*ABCC2* més baixos (70,71).

En aquesta línia, estudis de farmacocinètica van demostrar que l'al·lel T de rs3740066 es va associar amb AUC (àrea sota la corba) més altes de metabòlits d'irinotecà, probablement a causa de la disminució de l'activitat del transportador *ABCC2*. Aquestes dades suggereixen que la variant seria un indicador d'una proteïna amb una menor activitat transportadora que donaria

lloc a una acumulació superior del fàrmac. Això podria explicar un major risc de toxicitat hematològica en els pacients portadors de la variant i tractats amb antraciclins.

En la nostra cohort, també hem descrit que els pacients amb el genotip TT per *ABCC2* rs3740066 presentaven una menor SG que la resta de pacients. Després d'una revisió de la literatura, trobem que aquest resultat no ha estat reportat prèviament. Una possible hipòtesi podria ser que aquest efecte observat en la supervivència sigui perquè la majoria de pacients amb genotip TT va presentar neutropènia febril, amb els conseqüents retards en els tractaments successius i una necessitat de baixada de dosi. Aquests pacients, en la seva gran majoria, rebien un esquema d'antraciclins i ifosfamida concomitant. Com a norma general, en oncologia i en la fitxa tècnica de la majoria de citòxics, quan es presenta una toxicitat grau 4, els protocols indiquen la baixada de dosi d'un 20% de la quimioteràpia, que habitualment inclou tots els fàrmacs inclosos en l'esquema de tractament. És conegut que, al menys amb la ifosfamida, existeix una relació dosi-resposta (72), per tant, reduccions de dosi en aquest fàrmac atribuïdes a toxicitat podrien impactar en la probabilitat de resposta i en el pronòstic d'aquests pacients a llarg termini. Tanmateix, caldrien estudis de farmacocinètica per demostrar aquest efecte detrimental de la baixada de dosi amb la resposta a tractament.

L'altre SNP analitzat a *ABCC2*, rs2273697, també es va veure associat amb supervivència. En aquest cas, el genotip AA es va relacionar amb una pitjor SLR a 5 anys. En un estudi realitzat in vitro en línies cel·lulars, es va constatar que els pacients amb aquest polimorfisme, que és una variant no sinònima que provoca canvi d'aminoàcid, tenien una activitat superior de la bomba d'efflux amb una disminució de l'acumulació de doxorubicina, fet que explicaria una eficàcia inferior del fàrmac (73).

L'altre fàrmac que hem avaluat al nostre estudi farmacogenètic és la ifosfamida. La ifosfamida és un dels fàrmacs més utilitzats en el tractament dels sarcomes, i en general s'administra a altes dosis (fins a 14g/m²), motiu pel qual el risc d'efectes secundaris, com és la toxicitat neurològica, renal o urinària, a més de l'hematològica, és limitant en molts casos (40). En el nostre estudi, hem observat una associació significativa entre la variant *ALDH1A1* rs3764435 i la supervivència global a 5 anys. En estudis previs, s'havia descrit aquest polimorfisme amb un major risc de toxicitat hematològica en pacients amb càncer de mama tractats amb ciclofosfamida i doxorubicina (47), però no hi ha, que coneguem, estudis que relacionin aquest SNP amb el pronòstic.

Es tracta d'una variant intrònica amb funció desconeguda. El Regulome database li atorga una classificació 1f amb una probabilitat del 55% de què exerceixi una funció regulatòria (68,69).

D'altra banda, s'ha associat l'expressió elevada de l'enzim ALDH1A1 amb una pitjor supervivència lliure de malaltia i supervivència global en pacients amb càncer de mama tractades amb ciclofosfamida (74). L'ALDH1A1 participa en la conversió d'ifosfamida en el seu metabolit actiu, motiu pel qual les alteracions en la seva funcionalitat poden afectar la biodisponibilitat del fàrmac i, per tant, la supervivència.

En resum, en aquest estudi farmacogenètic s'estableixen, per primera vegada, associacions entre polimorfismes als gens *ABCC2* i *ALDH1A1* amb toxicitat i supervivència en sarcomes de parts toves localitzats candidats a tractament neoadjuvant amb antraciclina i/o ifosfamida. Tenint en compte la toxicitat d'aquests tractaments i la manca de factors predictius de toxicitat i resposta, els resultats obtinguts en aquest primer estudi es proposen com a generadors d'hipòtesis per futurs estudis de farmacogenètica dirigits a una personalització del tractament neoadjuvant.

6.2. Estudi CXCR4

Diversos estudis, fins i tot una metaanàlisi, han descrit l'expressió de CXCR4 com a factor de mal pronòstic en sarcomes (61), però aquests estudis no diferencien, en la major part dels casos, els diferents moments de la malaltia ni el tipus de tinció. El segon estudi d'aquesta tesi planteja si l'expressió de CXCR4 podia ser informativa del procés tumoral i/o variar en funció del moment de la malaltia i dels tractaments rebuts. Vam analitzar mostres en 3 punts diferents del procés oncològic: en el diagnòstic, a la cirurgia després de QT neoadjuvant i en la recaiguda. Vam determinar l'expressió de CXCR4 en les mostres tumorals en parafina, caracteritzant entre tinció nuclear i citoplasmàtica i ho vam analitzar pels diferents subtipus histològics.

El primer resultat destacat d'aquest segon estudi va ser la disminució global de la positivitat de CXCR4 després del tractament neoadjuvant. És una informació valuosa perquè podria estar detectant els pacients que més es beneficien del tractament. Hipotetitzem que els pacients amb tumors amb expressió positiva de CXCR4 al diagnòstic que negativitzen en la mostra postneoadjuvànica serien els més beneficiats per la quimioteràpia basada en antraciclina i ifosfamida. Aquesta teoria no es va poder confirmar en la nostra cohort per la limitada disponibilitat de biòpsies seriades amb resultats avaluables, però la disminució global de la positivitat de CXCR4 és un resultat prou important com per a seguir investigant en aquesta línia.

L'anàlisi de l'expressió nuclear i citoplasmàtica de CXCR4 per immunohistoquímica ens va portar al segon resultat. L'expressió citoplasmàtica de CXCR4 en mostres postquirúrgiques després de neoadjuvànica es va associar de forma no significativa amb pitjor SG en el global dels pacients, i

en el subgrup de sarcomes sinovials l'associació sí va ser significativa en termes de SLR i SG a 5 anys. Tot i que CXCR4 és un receptor de membrana, s'ha descrit que l'expressió determinada per immunohistoquímica de les cèl·lules tumorals pot ser tant nuclear, com citoplasmàtica, com de membrana (54). Això s'explica perquè la unió de CXCR4 amb CXCL12 induïx la internalització de CXCR4 i l'activació de la cascada de senyalització que condueix a la translocació de la membrana al citoplasma. S'ha descrit que l'expressió citoplasmàtica de CXCR4 en diferents tumors com el càncer de mama o el càncer de pulmó de cèl·lula no petita conferiria pitjor pronòstic, mentre que l'expressió nuclear indicaria un pronòstic més favorable (75–77). Els nostres resultats anirien en aquesta línia en el global dels pacients i en els sarcomes sinovials en particular.

El tercer resultat inèdit va ser que, en els pacients amb sarcomes pleomòrfics indiferenciats (UPS), l'expressió nuclear de CXCR4 en mostres pretractament es va relacionar amb un pitjor pronòstic en termes de SLR a 5 anys. Tot i que la majoria d'estudis en sarcomes de parts toves no diferencien entre expressió nuclear i citoplasmàtica (61), aquest resultat sembla oposat a les observacions prèvies en estudis realitzats en tumors epitelials com el càncer de mama o de pulmó (75,76). Tanmateix, les diferències intrínseques entre les neoplasies epitelials i les neoplasies mesenquimals podrien explicar el valor pronòstic discordant de l'expressió nuclear de CXCR4 en UPS i en tumors epitelials. En aquest sentit, Palmerini *et al*/van analitzar l'expressió per immunohistoquímica de CXCR4 en 88 pacients amb sarcoma sinovial i van observar que l'expressió nuclear de CXCR4 estava relacionada amb un pitjor pronòstic en termes de SG. Curiosament, en l'anàlisi de subgrups, aquest mal pronòstic estava limitat a pacients que no rebien quimioteràpia adjuvant, motiu pel qual els autors proposen que l'expressió nuclear de CXCR4 podria identificar un subgrup de pacients candidats a adjuvència i, fins i tot, que teràpies dirigides contra CXCR4 podrien actuar com a quimiosensibilitzadores (78). D'aquest resultat es podria pressuposar que l'expressió nuclear de CXCR4 en sarcomes al diagnòstic seria un predictor de sensibilitat a QT.

Així mateix, és coneguda que la sobreexpressió de CXCR4 és un marcador predictiu de malaltia metastàsica en diverses neoplasies (79). En UPS (abans anomenat histiocitoma fibrós maligne) s'han descrit in vivo i in vitro diferències d'expressió de CXCR4 entre una línia cel·lular de UPS de mandíbula inoculat en ratolins nus i una nova línia cel·lular a partir de ratolins als quals se'ls havia inoculat cèl·lules tumorals i havien desenvolupat metàstasis pulmonars, suggerint CXCR4 com a marcador potencial de metàstasi (80).

Aquests resultats obren la porta a seguir investigant si CXCR4 és a part d'un biomarcador pronòstic, un possible biomarcador predictiu de resposta a noves teràpies dirigides contra CXCR4 en SPT.

6.3. Limitacions

La limitació principal dels dos estudis que conformen aquesta tesi és el número de pacients estudiats, que compromet el poder estadístic de les anàlisis realitzades. Això és per la baixa incidència dels sarcomes de parts toves, els múltiples subtipus tumorals i al fet que es tracta d'un estudi unicèntric i, per aquest motiu, és difícil aconseguir suficients casos per fer estudis estadístics amb potència adequada. No obstant això, aquesta cohort és única i d'un alt valor investigador. Cal tenir present que en el diagnòstic dels sarcomes de parts toves és de vital importància la revisió histològica en un centre de referència amb patòlegs experts en la matèria. Cal assenyalar que es calcula que en fins a un 25% dels sarcomes existeix discordància en els diagnòstics (81). La institució dels pacients tractats en aquest estudi, l'Hospital de Sant Pau, és centre de referència espanyol (CSUR) i europeu (ERN EURACAN) en el diagnòstic i tractament dels tumors mesenquimals i té una àmplia experiència en el tractament amb quimioteràpia preoperatòria en SPT. Tot i la dificultat d'incloure una cohort de pacients nombrosa, són pacients molt ben caracteritzats a nivell histològic i tractats de manera homogènia després de valoració en un comitè multidisciplinari.

En referència a l'estudi farmacogenètic, una segona potencial limitació és la procedència dels ADN de dos tipus de teixit diferents. Donada la dificultat per l'obtenció de mostres, es va extreure l'ADN tant de mostres de sang com de mostres de teixit en parafina. No obstant això, estudis que comparen variants somàtiques i germinals en gens farmacogenètics indiquen una concordança pràcticament completa entre els dos tipus de mostres (29,82). Això ens fa pensar que són gens que no es veuen alterats durant el procés tumoral, i per tant, que el fet d'haver utilitzat els dos tipus d'ADN no ha afectat els nostres resultats.

A més, hi ha poca evidència de la funcionalitat de les variants identificades en aquesta tesi que ens indiquin una relació de causalitat. Tampoc disposem de mostra de validació que permeti extreure conclusions definitives. Malgrat això, i tot i ser un estudi generador d'hipòtesis, les variants identificades com a biomarcadores tenen un alt interès clínic per la seva possible contribució a un tractament personalitzat en sarcomes de parts toves.

Respecte al segon estudi, dels 48 pacients inclosos, en 18 dels casos no es va poder avaluar l'expressió de CXCR4 en la biòpsia inicial. Aquest fet és degut a què el diagnòstic dels sarcomes

de parts toves es fa mitjançant biòpsia amb agulla gruixuda i per arribar al diagnòstic definitiu cal realitzar múltiples tècniques anatomopatològiques que fan que en moltes ocasions no quedi teixit suficient per estudis d'investigació. Així mateix, en la major part dels casos no es va poder valorar l'expressió de CXCR4 en les mostres quirúrgiques postneoadjuvència pel fet que ni hi havia cèl·lules viables, ja que es produeixen canvis postractament com necrosi, fibrosi o hialinització.

7. CONCLUSIONS

1. Polimorfismes en gens involucrats en el metabolisme de les antraciclins i la ifosfamida poden actuar com biomarcadors pronòstics i/o predictius de toxicitat i supervivència en sarcomes de parts toves tractats amb quimioteràpia neoadjuvant.
 - Dos polimorfismes al gen *ABCC2* (rs3740066 i rs2272697) són biomarcadors de toxicitat hematològica a antraciclins i biomarcadors de pronòstic en pacients que reben quimioteràpia neoadjuvant.
 - El polimorfisme rs3764435 al gen *ALDH1A1* és un biomarcador de pitjor pronòstic en termes de supervivència lliure de recaiguda i supervivència global en pacients que reben quimioteràpia neoadjuvant basada en ifosfamida.
2. L'expressió de CXCR4 determinada per immunohistoquímica pot actuar com un biomarcador pronòstic en sarcomes de parts toves localitzats.
 - L'expressió de CXCR4 varia en el temps en funció dels tractaments rebuts i l'absència d'expressió citoplasmàtica de CXCR4 després de quimioteràpia neoadjuvant orienta a un millor pronòstic dels pacients.
 - En sarcomes sinovials, l'expressió citoplasmàtica de CXCR4 després de tractament neoadjuvant és un factor de mal pronòstic en termes de supervivència lliure de recaiguda i supervivència global.
 - En sarcomes pleomòrfics indiferenciats, l'expressió nuclear de CXCR4 en biòpsies inicials es relaciona amb una supervivència lliure de recaiguda inferior.

8. LÍNIES DE FUTUR

Els resultats obtinguts en la present tesi doctoral, si bé no permeten extreure conclusions definitives, sí obren noves vies d'investigació. Els dos projectes que es podrien generar a partir dels resultats presentats en aquesta tesi són:

- Un estudi prospectiu multicèntric amb pacients diagnosticats de sarcomes de parts toves localitzats en els quals es proposi tractament de quimioteràpia neoadjuvant que permetria validar els biomarcadors farmacogenètics identificats. En aquest estudi, s'inclouria una anàlisi més exhaustiva de gens candidats amb una major cobertura de les variants genètiques. La identificació i validació de marcadors farmacogenètics ens dotaria d'una eina valuosa en la predicció del risc de toxicitat: permetria ajustar la dosi per disminuir-ne el risc de toxicitat en un subgrup de pacients i contribuir a avançar cap a la medicina personalitzada.
- Un estudi de validació de CXCR4 com a biomarcador en sarcomes de parts toves, en histologies específiques com són els sarcomes sinovials i UPS. La informació que es generés es podria utilitzar en el desenvolupament de nous tractaments dirigits contra CXCR4, per identificar subgrups de pacients amb especial benefici potencial de les noves teràpies.

Actualment, hi ha una línia d'investigació oberta del Grup d'Oncogènesi i Antitumorals de l'Institut de Recerca de l'HSCSP i la Universitat Autònoma de Barcelona, que estan desenvolupant un nanoconjugat dirigit contra CXCR4 i s'han vist resultats encoratjadors en diferents tipus de neoplàsies sòlides i hematològiques (62–65). Per tot això, els resultats d'aquesta tesi doctoral esperonen en seguir investigant en aquesta línia.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Soft Tissue and Bone Tumours. International Agency for Research on Cancer; 2020. 607 p.
2. Gatta G, Capocaccia R, Botta L, Mallone S, Angelis RD, Ardanaz E, et al. Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet—a population-based study. *Lancet Oncol*. 1 agost 2017;18(8):1022-39.
3. Stiller CA, Botta L, Brewster DH, Ho VKY, Frezza AM, Whelan J, et al. Survival of adults with cancers of bone or soft tissue in Europe—Report from the EUROCare-5 study. *Cancer Epidemiol*. 1 octubre 2018;56:146-53.
4. Jr VTD, Lawrence TS, Rosenberg SA, DePinho RA, Weinberg RA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 2800 p.
5. Sbaraglia M, Bellan E, Tos APD. The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: news and perspectives. *Pathol - J Ital Soc Anat Pathol Diagn Cytopathol*. 2021;113:70-84.
6. Damerell V, Pepper MS, Prince S. Molecular mechanisms underpinning sarcomas and implications for current and future therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 30 juny 2021;6(1):1-19.
7. Heslin MJ, Lewis JJ, Woodruff JM, Brennan MF. Core needle biopsy for diagnosis of extremity soft tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol*. 1997;4(5):425-31.
8. Gronchi A, Miah AB, Dei Tos AP, Abecassis N, Bajpai J, Bauer S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN-GENTURIS Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up★. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. novembre 2021;32(11):1348-65.
9. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. John Wiley & Sons; 2017. 272 p.
10. Pisters PW, Leung DH, Woodruff J, Shi W, Brennan MF. Analysis of prognostic factors in 1,041 patients with localized soft tissue sarcomas of the extremities. *J Clin Oncol*. maig 1996;14(5):1679-89.
11. Coindre JM, Terrier P, Bui NB, Bonichon F, Collin F, Le Doussal V, et al. Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *J Clin Oncol*. març 1996;14(3):869-77.
12. Kattan MW, Leung DHY, Brennan MF. Postoperative nomogram for 12-year sarcoma-specific death. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 febrer 2002;20(3):791-6.
13. Mariani L, Miceli R, Kattan MW, Brennan MF, Colecchia M, Fiore M, et al. Validation and adaptation of a nomogram for predicting the survival of patients with extremity soft tissue sarcoma using a three-grade system. *Cancer*. 15 gener 2005;103(2):402-8.
14. Callegaro D, Miceli R, Bonvalot S, Ferguson P, Strauss DC, Levy A, et al. Development and external validation of two nomograms to predict overall survival and occurrence of

- distant metastases in adults after surgical resection of localised soft-tissue sarcomas of the extremities: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* maig 2016;17(5):671-80.
15. Chibon F, Lagarde P, Salas S, Pérot G, Brouste V, Tirode F, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med.* juliol 2010;16(7):781-7.
 16. Frezza AM, Stacchiotti S, Chibon F, Coindre JM, Italiano A, Romagnosa C, et al. CINSARC in high-risk soft tissue sarcoma patients treated with neoadjuvant chemotherapy: Results from the ISG-STs 1001 study. *Cancer Med.* gener 2023;12(2):1350-7.
 17. Yang JC, Chang AE, Baker AR, Sindelar WF, Danforth DN, Topalian SL, et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* gener 1998;16(1):197-203.
 18. Beane JD, Yang JC, White D, Steinberg SM, Rosenberg SA, Rudloff U. Efficacy of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcoma of the extremity: 20-year follow-up of a randomized prospective trial. *Ann Surg Oncol.* agost 2014;21(8):2484-9.
 19. O'Sullivan B, Davis Am, Turcotte R, Bell R, Catton C, P C, et al. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *PubMed [Internet].* 2002 [citat 29 agost 2024]; Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12103287/>
 20. Albertsmeier M, Rauch A, Roeder F, Hasenhütl S, Pratschke S, Kirschneck M, et al. External Beam Radiation Therapy for Resectable Soft Tissue Sarcoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Surg Oncol.* març 2018;25(3):754-67.
 21. Salerno KE, Alektiar KM, Baldini EH, Bedi M, Bishop AJ, Bradfield L, et al. Radiation Therapy for Treatment of Soft Tissue Sarcoma in Adults: Executive Summary of an ASTRO Clinical Practice Guideline. *Pract Radiat Oncol.* 1 setembre 2021;11(5):339-51.
 22. Sarcoma Meta-analysis Collaboration. Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults: meta-analysis of individual data. *Sarcoma Meta-analysis Collaboration. Lancet Lond Engl.* 6 desembre 1997;350(9092):1647-54.
 23. Frustaci S, Gherlinzoni F, De Paoli A, Bonetti M, Azzarelli A, Comandone A, et al. Adjuvant chemotherapy for adult soft tissue sarcomas of the extremities and girdles: results of the Italian randomized cooperative trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 març 2001;19(5):1238-47.
 24. Pervaiz N, Colterjohn N, Farrokhyar F, Tozer R, Figueredo A, Ghert M. A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. *Cancer.* 2008;113(3):573-81.
 25. Woll PJ, Reichardt P, Le Cesne A, Bonvalot S, Azzarelli A, Hoekstra HJ, et al. Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and lenograstim for resected soft-tissue sarcoma (EORTC 62931): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* octubre 2012;13(10):1045-54.
 26. Pasquali S, Pizzamiglio S, Touati N, Litiere S, Marreaud S, Kasper B, et al. The impact of chemotherapy on survival of patients with extremity and trunk wall soft tissue sarcoma:

- revisiting the results of the EORTC-STBSG 62931 randomised trial. *Eur J Cancer*. 1 març 2019;109:51-60.
27. Gronchi A, Stacchiotti S, Verderio P, Ferrari S, Martin Broto J, Lopez-Pousa A, et al. Short, full-dose adjuvant chemotherapy (CT) in high-risk adult soft tissue sarcomas (STS): long-term follow-up of a randomized clinical trial from the Italian Sarcoma Group and the Spanish Sarcoma Group. *Ann Oncol*. 1 desembre 2016;27(12):2283-8.
 28. Gronchi A, Ferrari S, Quagliuolo V, Broto JM, Pousa AL, Grignani G, et al. Histotype-tailored neoadjuvant chemotherapy versus standard chemotherapy in patients with high-risk soft-tissue sarcomas (ISG-ST5 1001): an international, open-label, randomised, controlled, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol*. juny 2017;18(6):812-22.
 29. Sebio A, Paré L, Páez D, Salazar J, González A, Sala N, et al. The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA ... : Pharmacogenetics and Genomics. 2013 [citat 22 novembre 2024]; Disponible a: https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/fulltext/2013/03000/the_lcs6_polymorphism_in_the_binding_site_of_let_7.5.aspx
 30. National Comprehensive Cancer Network. National Comprehensive Cancer Network. Soft Tissue Sarcoma (version 1.24) [Internet]. 2024. Disponible a: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/sarcoma.pdf
 31. Baldini EH, Le Cesne A, Trent JC. Neoadjuvant Chemotherapy, Concurrent Chemoradiation, and Adjuvant Chemotherapy for High-Risk Extremity Soft Tissue Sarcoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. maig 2018;(38):910-5.
 32. Bontenbal M, Andersson M, Wildiers J, Cocconi G, Jassem J, Paridaens R, et al. Doxorubicin vs epirubicin, report of a second-line randomized phase II/III study in advanced breast cancer. EORTC Breast Cancer Cooperative Group. *Br J Cancer*. juny 1998;77(12):2257-63.
 33. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. juliol 2011;21(7):440-6.
 34. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1 abril 1999;57(7):727-41.
 35. Lal S, Mahajan A, Chen WN, Chowbay B. Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review. *Curr Drug Metab. gener* 2010;11(1):115-28.
 36. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*. maig 2009;1794(5):860-71.
 37. Okabe M, Unno M, Harigae H, Kaku M, Okitsu Y, Sasaki T, et al. Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer. *Biochem Biophys Res Commun*. 5 agost 2005;333(3):754-62.
 38. Fagerholm R, Hofstetter B, Tammiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet*. juliol 2008;40(7):844-53.

39. Fan L, Goh BC, Wong CI, Sukri N, Lim SE, Tan SH, et al. Genotype of human carbonyl reductase CBR3 correlates with doxorubicin disposition and toxicity. *Pharmacogenet Genomics*. juliol 2008;18(7):621-31.
40. Lowenberg D, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: ifosfamide pathways, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. febrer 2014;24(2):133.
41. Palassini E, Ferrari S, Verderio P, De Paoli A, Martin Broto J, Quagliuolo V, et al. Feasibility of Preoperative Chemotherapy With or Without Radiation Therapy in Localized Soft Tissue Sarcomas of Limbs and Superficial Trunk in the Italian Sarcoma Group/Grupo Español de Investigación en Sarcomas Randomized Clinical Trial: Three Versus Five Cycles of Full-Dose Epirubicin Plus Ifosfamide. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 novembre 2015;33(31):3628-34.
42. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *N Engl J Med*. 6 febrer 2003;348(6):538-49.
43. Tecza K, Pamula-Pilat J, Lanuszevska J, Butkiewicz D, Grzybowska E. Pharmacogenetics of toxicity of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients. *Oncotarget*. 6 febrer 2018;9(10):9114-36.
44. Lal S, Wong ZW, Sandanaraj E, Xiang X, Ang PCS, Lee EJD, et al. Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci*. abril 2008;99(4):816-23.
45. Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole M, Verrill M, Jamieson D, et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer*. 16 març 2010;102(6):1003-9.
46. Geng R, Chen Z, Zhao X, Qiu L, Liu X, Liu R, et al. Oxidative stress-related genetic polymorphisms are associated with the prognosis of metastatic gastric cancer patients treated with epirubicin, oxaliplatin and 5-fluorouracil combination chemotherapy. *PLoS One*. 2014;9(12):e116027.
47. Yao S, Sucheston LE, Zhao H, Barlow WE, Zirpoli G, Liu S, et al. Germline genetic variants in ABCB1, ABCC1 and ALDH1A1, and risk of hematological and gastrointestinal toxicities in a SWOG Phase III trial S0221 for breast cancer. *Pharmacogenomics J*. juny 2014;14(3):241-7.
48. Ikeda M, Tsuji D, Yamamoto K, Kim YI, Daimon T, Iwabe Y, et al. Relationship between ABCB1 gene polymorphisms and severe neutropenia in patients with breast cancer treated with doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy. *Drug Metab Pharmacokinet*. 1 abril 2015;30(2):149-53.
49. Caronia D, Patiño-García A, Pérez-Martínez A, Pita G, Moreno LT, Zalacain-Díez M, et al. Effect of ABCB1 and ABCC3 Polymorphisms on Osteosarcoma Survival after Chemotherapy: A Pharmacogenetic Study. [citad 5 novembre 2024]; Disponible a: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026091>
50. Jamieson D, Cresti N, Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Hawsawi NM, et al. Two minor NQO1 and NQO2 alleles predict poor response of breast cancer patients to adjuvant doxorubicin

- and cyclophosphamide therapy. *Pharmacogenet Genomics*. desembre 2011;21(12):808-19.
51. Chaturvedi P, Tulsyan S, Agarwal G, Lal P, Agrawal S, Mittal RD, et al. Relationship of MTHFR and NQO1 Pharmacogenetics and Chemotherapy Clinical Outcomes in Breast Cancer Patients. *Biochem Genet*. agost 2015;53(7-8):211-22.
 52. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*. agost 2018;285(16):2944-71.
 53. Yang Y, Li J, Lei W, Wang H, Ni Y, Liu Y, et al. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: from Mechanisms to Clinical Applications. 2023 [citat 8 novembre 2024]; Disponible a: <https://www.ijbs.com/v19p3341.htm>
 54. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res*. 2014;124:31-82.
 55. Janssens R, Struyf S, Proost P. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol*. abril 2018;15(4):299-311.
 56. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res*. 31 maig 2010;16(11):2927-31.
 57. Qiu L, Xu Y, Xu H, Yu B. The clinicopathological and prognostic value of CXCR4 expression in patients with lung cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 21 juny 2022;22(1):681.
 58. Lv S, Yang Y, Kwon S, Han M, Zhao F, Kang H, et al. The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients: a meta-analysis. *Histopathology*. abril 2014;64(5):701-12.
 59. Liu CF, Liu SY, Min XY, Ji YY, Wang N, Liu D, et al. The Prognostic Value of CXCR4 in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 21 març 2014;9(3):e92629.
 60. Si X, Ma J, Yu F, Zhao H, Huang H, Sun YW. Clinicopathological and prognostic significance of CXCR4 high expression in renal cell carcinoma: A meta-analysis and literature review. *Int J Surg*. 1 novembre 2019;71:12-8.
 61. Li YJ, Dai YL, Zhang WB, Li SJ, Tu CQ. Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis. *Clin Exp Med*. 1 febrer 2017;17(1):59-69.
 62. Unzueta U, Céspedes MV, Ferrer-Miralles N, Casanova I, Cedano J, Corchero JL, et al. Intracellular CXCR4+ cell targeting with T22-empowered protein-only na | *IJN*. 2012 [citat 8 novembre 2024]; Disponible a: <https://www.dovepress.com/intracellular-cxcr4-cell-targeting-with-t22-empowered-protein-only-nan-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>
 63. Céspedes MV, Unzueta U, Aviñó A, Gallardo A, Álamo P, Sala R, et al. Selective depletion of metastatic stem cells as therapy for human colorectal cancer. *EMBO Mol Med*. octubre 2018;10(10):e8772.
 64. Rioja-Blanco E, Gallardo A, Arroyo-Solera, Álamo P, Casanova I, Unzueta U, et al. A Novel CXCR4-Targeted Diphtheria Toxin Nanoparticle Inhibits Invasion and Metastatic Dissemination in a Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Mouse Model. *PubMed*

- [Internet]. 2022 [citat 8 novembre 2024]; Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35456719/>
65. Medina-Gutiérrez E, García-León A, Gallardo A, Álamo P, Alba-Castellón L, Unzueta U, et al. Potent Anticancer Activity of CXCR4-Targeted Nanostructured Toxins in Aggressive Endometrial Cancer Models. *Cancers*. 23 desembre 2022;15(1):85.
 66. Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*. 29 juny 2010;10(1):337.
 67. Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci*. 1 gener 2004;21(1):25-51.
 68. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. 1 setembre 2012 [citat 7 novembre 2024]; Disponible a: <https://genome.cshlp.org/content/22/9/1790.long>
 69. Dong S, Zhao N, Spragins E, Kagda MS, Li M, Assis P, et al. Annotating and prioritizing human non-coding variants with RegulomeDB. 20 octubre 2022 [citat 7 novembre 2024]; Disponible a: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.10.18.512627v1>
 70. Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund S, et al. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J*. febrer 2007;7(1):56-65.
 71. Haenisch S, May K, Wegner D, Caliebe A, Cascorbi I, Siegmund W. Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression ... : *Pharmacogenetics and Genomics*. [citat 4 novembre 2024]; Disponible a: https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/fulltext/2008/04000/influence_of_genetic_polymorphisms_on_intestinal.9.aspx
 72. Patel SR, Vadhan-Raj S, Papadopolous N, Plager C, Burgess MA, Hays C, et al. High-dose ifosfamide in bone and soft tissue sarcomas: results of phase II and pilot studies--dose-response and schedule dependence. *J Clin Oncol*. juny 1997;15(6):2378-84.
 73. Lian G, Yuan J, Gao Y. In vitro Transport Ability of ABCC2 (G1249A) Polymorphic Variant Towar | OTT. [citat 29 novembre 2024]; Disponible a: <https://www.dovepress.com/in-vitro-transport-ability-of-abcc2-g1249a-polymorphic-variant-towards-peer-reviewed-fulltext-article-OTT>
 74. Khoury T, Ademuyiwa FO, Chandraseekhar R, Jabbour M, DeLeo A, Ferrone S, et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol*. 1 març 2012;25(3):388-97.
 75. Wagner PL, Hyjek E, Vazquez MF, Meherally D, Liu YF, Chadwick PA, et al. CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: Association with metastasis and survival. [citat 27 novembre 2024]; Disponible a: [https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223\(08\)01257-9/fulltext](https://www.jtcvs.org/article/S0022-5223(08)01257-9/fulltext)

76. Su YC, Wu MT, Huang CJ, Hou MF, Yang SF, Chai CY. Expression of CXCR4 is associated with axillary lymph node status in patients with early breast cancer. [citat 27 novembre 2024]; Disponible a: [https://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776\(05\)00223-7/abstract](https://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776(05)00223-7/abstract)
77. Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene*. febrer 2016;35(7):816-26.
78. Palmerini E, Benassi MS, Quattrini I, Pazzaglia L, Donati D, Benini S, et al. Prognostic and predictive role of CXCR4, IGF-1R and Ezrin expression in localized synovial sarcoma: is chemotaxis important to tumor response? *Orphanet J Rare Dis*. 23 gener 2015;10(1):6.
79. Kim RH, Li BDL, Chu QD. The Role of Chemokine Receptor CXCR4 in the Biologic Behavior of Human Soft Tissue Sarcoma. *Sarcoma*. 2011;2011(1):593708.
80. Maeda T, Hashitani S, Zushi Y, Segawa E, Tanaka N, Sakurai K, et al. Establishment of a nude mouse transplantable model of a human malignant fibrous histiocytoma of the mandible with high metastatic potential to the lung. *J Cancer Res Clin Oncol*. 4 març 2008;134(9):1005-11.
81. Ray-Coquard I, Montesco MC, Coindre JM, Dei Tos AP, Lurkin A, Ranchère-Vince D, et al. Sarcoma: concordance between initial diagnosis and centralized expert review in a population-based study within three European regions. *Ann Oncol*. 1 setembre 2012;23(9):2442-9.
82. McWhinney SR, McLeod HL. Using Germline Genotype in Cancer Pharmacogenetic Studies. *Pharmacogenomics*. 1 març 2009;10(3):489-93.