



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Importancia clínico-patológica y pronóstica de la
expresión de CD47 en tumores neuroendocrinos de
pulmón.**

**ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN
ARTÍCULO ACADÉMICO**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA
PRESENTA:**

ELSA MARÍA LUISA DOSAL MANCILLA



TUTORA: DRA. NORMA YANET HERNÁNDEZ PEDRO

CIUDAD DE MÉXICO, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION	1
DESARROLLO DE LA TEMATICA DE ESTUDIO	3
Materiales y métodos	3
Pacientes y diseño del estudio.....	3
Inmunohistoquímica para CD47 y Ki-67.....	3
Análisis estadístico.....	4
Resultados.....	5
<i>Características clínicas basales</i>	5
Asociación del porcentaje de CD47 con características clínicas.....	7
Supervivencia libre de progresión y supervivencia general.....	7
Pronóstico en pacientes positivos a CD47 y Ki-67≥40%.....	10
DISCUSIÓN	11
CONCLUSIONES	14
BIBLIOGRAFÍA.....	14

RESUMEN

Los tumores neuroendocrinos pulmonares (LNET) representan aproximadamente el 15% de todos los casos de cáncer de pulmón. Se dividen en carcinoide típico (CT), carcinoide atípico (AC), carcinoma neuroendócrino de células grandes (LCNEC) y carcinoma de células pequeñas (SCLC).

Ki-67 se ha utilizado durante décadas para evaluar los recuentos mitóticos, sin embargo, el rol de Ki-67 como biomarcador para evaluaciones, pronósticos y guías en LNET metastásico aún no cuenta con validación clínica factible. Pruebas clínicas recientes han indicado que la inhibición de CD47 con anticuerpos resistentes a CD47 ejerce un efecto anti tumor prometedor ante muchas malignidades humanas, incluyendo NSCLC, melanomas y malignidades hematológicas. Sin embargo, la importancia clínica de la expresión de CD47 en los tumores neuroendocrinos pulmonares ha sido confuso.

Se aplicó un estudio retrospectivo en el cual se analizaron biopsias de 51 pacientes con diagnóstico confirmado de tumores neuroendocrinos pulmonares que recibieron tratamiento en el INCan. Después se analizó si había alguna correlación entre la expresión de CD47 y otra característica patológica o clínica. A su vez se analizó la importancia pronóstica de CD47, se evaluó como supervivencia libre de progresión y supervivencia global. Como resultado un total de 51 pacientes con tumores neuroendocrinos de pulmón fueron involucrados en nuestro estudio, la edad promedio era de 57.6 (± 11.6) años; 30 pacientes eran mujeres (59%). 27.5% de los pacientes fueron negativos. En pacientes con un alto nivel de tumores (esta vez definida como Ki-67 $\geq 40\%$), la expresión positiva del agente CD47 fue fuertemente asociada con el aumento de SLP. Sin embargo, estas diferencias no llegaron a una significancia estadística cuando se analizó OS.

INTRODUCCION

Los tumores neuroendocrinos de pulmón (LNET) representan aproximadamente el 15% de todos los casos de cáncer de pulmón [1,2]. LNET se subdividen en carcinoide típico (TC), carcinoide atípico (AC), carcinoma neuroendócrino de células grandes (LCNEC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) [3].

El criterio de clasificación para los tumores neuroendocrinos pulmonares incluye el conteo de células mitóticas, la presencia o ausencia de necrosis, características citológicas e histológicas incluyendo el tamaño de las células y la forma y características nucleares. Clínicamente, los TC son tumores de poca malignidad,

AC de malignidad media y los LCNEC/SCLC son carcinomas altamente malignos que crecen rápidamente y presentan metástasis temprana (4,5). El índice Ki-67 ha sido usado por décadas para evaluar el conteo mitótico; sin embargo, Ki-67 como biomarcador para la evaluación de pronosis y la guía terapéutica en LNET metastásico es importante ya que la evidencia para evaluar la pronosis y guía terapéutica en LNET metastásico aún carece de validación clínica factible [6].

La quimioterapia es el cuidado estándar para pacientes con LNET que presentan un estado de la enfermedad avanzado. Aunque inicialmente algunos LNET muestran respuestas positivas al tratamiento, la mayoría de los pacientes sufren recaídas y se vuelven resistentes a la quimioterapia; en consecuencia, el pronóstico de los pacientes es pobre, con una supervivencia promedio de 5 años en menos del 5%. Los puntos de control inmunitario ejercen un papel en el crecimiento y desarrollo tumoral mediante la inhibición de la actividad de las células inmunes que se infiltran en el tumor, son un sistema de señalización que regulará la autoinmunidad en el sistema inmune. Actualmente se usa el bloqueo de los puntos de control inmunitario (ICI) como PD-1, PD-L1, CTLA-4 y CD47 que son utilizados como inmunosupresores por algunas células tumorales para no ser detectadas [7].

En años recientes, la inmunoterapia cambió el escenario para LNET; debido a una alta inmunogenicidad, una alta carga de mutaciones tumorales y otros factores de inmunidad favorables, los ICI podrían convertirse en un avance en el tratamiento de LNET [8-10].

CD47 es una proteína de superficie celular que normalmente se expresa en niveles bajos en todas las células sanas. Una de sus funciones es que actúa como inhibidor de la fagocitosis; esto ocurre durante la interacción con SIRP α expresada en macrófagos; respectivamente, una señal baja de CD47 lleva a la fagocitosis de células dañadas o viejas. Sin embargo, CD47 está implicado en otras funciones, incluyendo proliferación, apoptosis y matriz celular-extracelular a través de la ligadura con trombospondinas [11,12].

Este marcador inmune fue identificado como un antígeno tumoral en cáncer de ovario, desde entonces se encontró que CD47 se ha sobre expresado en múltiples neoplasias malignas hematológicas y no hematológicas, incluyendo la leucemia mieloide crónica, linfoma de Hodgkin [13] mieloma múltiple [14], cáncer de mama [15], cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) [16,17] y cáncer de páncreas [18]. El aumento en la expresión de CD47 en tumores permite a las células malignas escapar de la vigilancia inmunológica innata a través de la evasión de fagocitosis al interactuar con SIRP α en células mieloides. De esta manera, las células cancerosas emiten la señal de “no me comas” proporcionado por CD47 y evitan un componente fundamental de respuesta inmune antitumoral [19]. Pruebas

clínicas recientes indican que la inhibición de esta vía con anti-CD47, ejerce un efecto antitumoral prometedor contra varias neoplasias malignas humanas, incluyendo NSCLC, melanomas y neoplasias malignas hematológicas [20,21]. Sin embargo, la relevancia clínica de la expresión de CD47 en LNET sigue sin ser clara.

Los objetivos del presente estudio es saber si la expresión de CD47 en LNET tiene relevancia pronóstica y determinar si está asociada con alguna otra característica clínica o histológica.

DESARROLLO DE LA TEMATICA DE ESTUDIO

Materiales y métodos

Pacientes y diseño del estudio.

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo en el cual se analizaron biopsias de tumores de 51 pacientes con un diagnóstico confirmado de LNET que recibieron tratamiento en el hospital (*Instituto Nacional de Cancerología*, Ciudad de México, México) entre marzo del 2012 y septiembre del 2020.

Los pacientes fueron incluidos si cumplían con los siguientes requisitos:

>18 años de edad, histología confirmada de LNET, estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOGPS) ≤ 2 , y estado III-IV al tomar la biopsia del tumor.

Los pacientes fueron excluidos si el tejido disponible no era suficiente para realizar ensayos de IHC según lo planeado. Las características clínicas y patológicas que fueron recolectadas del historial clínico fueron: edad, género, historial de tabaquismo, estado de la enfermedad, subtipo histológico y sitio de metástasis (si había); todos los datos relevantes fueron recolectados de tablas medicas electrónicas. El protocolo entero fue realizado de acuerdo con los estándares éticos de la Junta de Revisión Institucional, así como del Comité Ético del INCan (011/018/ICI-CV/683) y de acuerdo a la declaración de Hellsinki de 1975.

Inmunohistoquímica para CD47 y Ki-67.

Para el análisis de IHC, se tomaron muestras de secciones de tejido de 5µm en parafina fijada, fueron desparafinadas y se bloquearon con peróxido de hidrógeno. Después, la recuperación de antígenos fue llevada a cabo con un citrato

recuperador de ADN por calor inmune (BSB 0023, Bio SB Inc.). Las muestras se lavaron con solución salina tamponada con Tris 1x (TBS Automation Wash Buffer, 40x) y fueron incubadas con un anticuerpo anti-CD47 (clon: B6H12, 1:50, 12730; Santa Cruz Biotechnology) y Ki-67 (anticuerpo Ki-67; 15580; Abcam) a temperatura ambiente durante 45 minutos.

La reacción se visualizó usando el kit universal MACH4 polimero-HRP (MIU539, Biocare) continuando con la incubación con diaminobencidina o DAB durante 3 minutos. Después, las muestras fueron teñidas con hematoxilina e hidróxido de amonio.

Se utilizó IgG con un isotipo coincidente como control para tinción y un tejido prostático fue utilizado como un control positivo para CD47. Un patólogo revisó bajo el microscopio las muestras. La intensidad de tinción de CD47 y el porcentaje de células teñidas fueron reportadas en la (Fig1).

La intensidad de tinción de la membrana celular se dividió en 4 categorías de la siguiente manera: sin tinción, 0; tinción débil, 1+ (tinción de membrana marrón claro); tinción intermedia, 2+; y tinción fuerte, 3+ (tinción de membrana lineal marrón oscuro). Para definiciones de puntaje más confiables, la tinción fuerte (3+) fue claramente visible usando una lente de objetivo de 4x, la tinción moderada (2+) requirió una lente de objetivo de 10x para una observación clara y la tinción débil (1+) requirió una lente de objetivo de 40x. La multiplicación de la intensidad de la tinción y el porcentaje de células inmunorreactivas dio como resultado un sistema de puntuación de inmunoreactividad, que va de 0 a 300 para cada caso individual.

Análisis estadístico.

Con propósito descriptivo los datos continuos fueron resumidos en medias aritméticas con desviación estándar (SD). La distribución de la información fue evaluado a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre grupos fue llevada a cabo a través del *T*-test estudiantil o el *U*-test, dependiendo de la distribución de la información. La información de las tablas de contingencia fue analizada usando una prueba de chi-cuadrada o la prueba exacta de Fisher's.

La tasa de supervivencia (OS) y la supervivencia libre de progresión (PFS) fueron estimadas por el método de Kaplan-Meier; las comparaciones entre grupos fueron analizadas con el método Log-rank.

Para analizar la curva de supervivencia, todas las variables fueron dicotomizadas (para las edades se usaron medias). El ajuste para potenciales factores de confusión se abordó con un análisis multivariante de regresión de Cox, y se estimaron los cocientes de riesgos junto con sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (CI). Se consideró estadísticamente significativo un valor p de dos caras $\leq 0,05$. Los datos se analizaron con el paquete informático SPSS versión 26 (SPSS, IBM, Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

Resultados

Características clínicas basales

Un total de 51 pacientes con LNET se enlistaron en el estudio, la edad media de diagnóstico fue de 57.6 (± 11.6) años, de los cuales 30 pacientes fueron mujeres (59%).

Aproximadamente 60% de los pacientes eran fumadores, con una media de índice de tabaco de 48.2 (± 39.2), la mayoría de los pacientes presentaron ECOG PS < 2 al momento del diagnóstico (78.4). El subtipo histológico más frecuente fue SCLC el cual fue encontrado en 29 pacientes (56.9%).

De acuerdo con el índice Ki-67, 74.5% de los casos fueron considerados como alto grado y el 25% restante fue clasificado como bajo grado. 72.5% de los pacientes presentaron una etapa IV de la enfermedad, mientras que el otro 27.5 (14%) presentaron una etapa IIB. Otras características base de la población fueron presentados en la tabla 1.

Tabla1. Características generales de la población según la expresión de CD47 (positivo vs. negativo).

Characteristics	Categories	ALL % (n) (N = 51)	CD47- % (n) (N = 37)	CD47+ % (n) (N = 14)	p value
Gender	Female	59 (30)	66.7 (20)	33.3 (10)	0.346
	Male	41 (21)	81 (17)	19 (4)	
Age	Median (\pm SD)				0.120
	<60 years	54.9 (28)	82.1 (23)	17.9 (5)	
	\geq 60 years	45.1 (23)	60.9 (14)	39.1 (9)	
Smoking history	Nonsmoker	39.2 (20)	27.5 (14)	30 (6)	0.758
	Smoker	60.8 (31)	77.5 (23)	25.8 (8)	
ECOG PS	0-1	78.4 (40)	70 (28)	30 (12)	0.705
	2+	21.6 (11)	81.8 (9)	18.2 (2)	
Disease stage	IIIB	27.5 (14)	71.4 (10)	28.6 (4)	1.0
	IV	72.5 (37)	73 (27)	27 (10)	
Histological grade	Carcinoid	15.7 (8)	75 (6)	25 (2)	0.804
	Atypical	7.8 (4)	75 (3)	25 (1)	
	Large cells	19.6 (10)	60 (6)	40 (4)	
Lung metastases	Small cells	56.9 (29)	75.9 (22)	24.1 (7)	0.661
	Absent	88.2 (45)	73.3 (33)	26.7 (12)	
	Present	11.8 (6)	66.7 (4)	33.3 (2)	
Bone metastases	Absent	84.3 (43)	72.1 (31)	27.9 (12)	1.0
	Present	15.7 (8)	75 (6)	25 (2)	
Pleural effusion	Absent	78.4 (40)	67.5 (27)	32.5 (13)	0.251
	Present	21.6 (11)	90.9 (10)	9.1 (1)	
CNS metastases	Absent	72.5 (37)	73 (27)	27 (10)	1.0
	Present	27.5 (14)	71.4 (10)	28.6 (4)	
Liver metastases	Absent	80.4 (41)	68.3 (28)	31.7 (13)	0.250
	Present	19.6 (10)	90 (9)	10 (1)	
Adrenal metastases	Absent	88.2 (45)	73.3 (33)	26.7 (12)	0.661
	Present	11.8 (6)	66.7 (4)	33.3 (2)	
CD47	Positive	72.5 (37)			0.771
	Negative	27.5 (14)			
Ki-67	5-19%	17.6 (9)	77.8 (7)	22.2 (2)	0.771
	20-39%	5.9 (3)	66.7 (2)	33.3 (1)	
	40-80%	19.6 (10)	60 (6)	40 (4)	
	50-100%	56.9 (29)	75.9 (22)	24.1 (7)	

Se realizó un análisis inmunohistoquímico para evaluar el nivel de expresión de la proteína CD47 en los tejidos de LNET y en la mucosa adyacente. La tinción de IHC mostró que CD47 se localizaba principalmente en la membrana citoplasmática de las células tumorales y, en menor medida, de forma difusa en el citoplasma (Figura

1). Sin embargo, existía una variabilidad significativa en la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas entre los pacientes.

El 27,5% de los pacientes eran positivos para la expresión de CD47, y el 72,5% de los pacientes mostraban una expresión de CD47 inferior al 1% y se consideraron negativos.

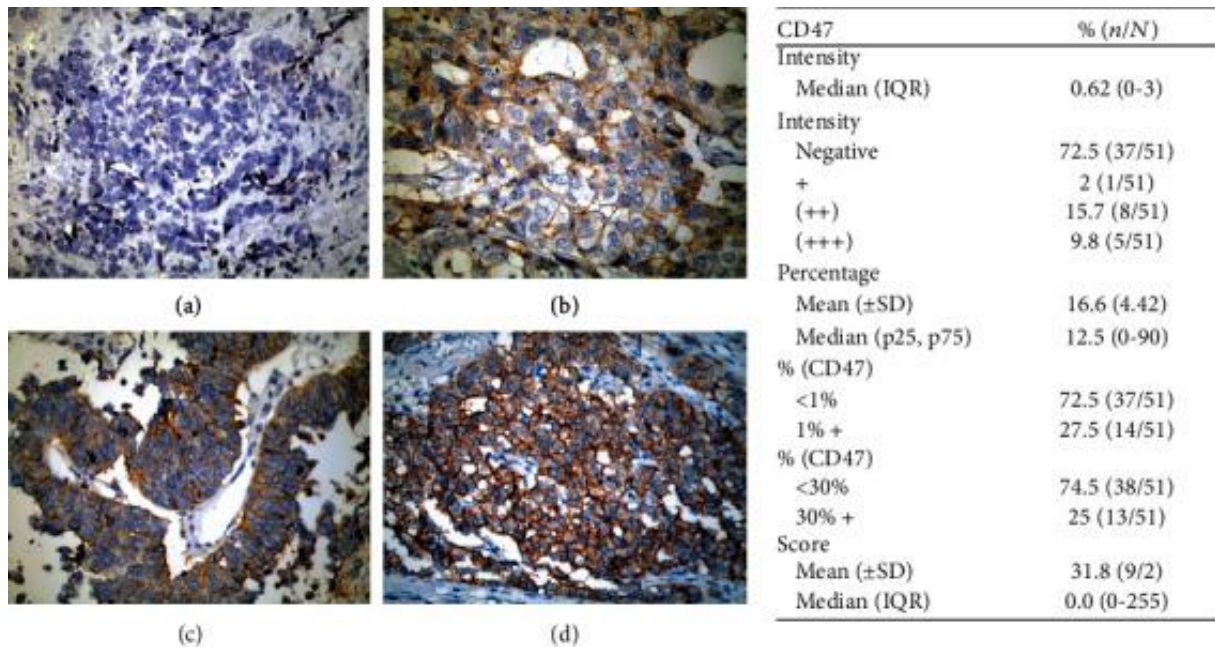


Figura 1. **Expresión de CD47 en toda la población (51 pacientes).** Imágenes que ejemplifican la expresión negativa de CD47 (a), + expresión de CD47 (b), ++ expresión de CD47 (c) y +++ expresión de CD47 (d).

Asociación del porcentaje de CD47 con características clínicas

Basado en los porcentajes de índice de teñido, 51 pacientes fueron estratificados en dos grupos; aquellos con CD47 negativo (-) (HScore <30) (n=37) y aquellos con CD47 positivo (+) (n=14). La tabla 1 muestra las características base de los pacientes con LNET de acuerdo al estatus del CD47.

No se encontraron diferencias entre los grupos de expresión alta y los de expresión baja (Tabla 1).

Supervivencia libre de progresión y supervivencia general.

La media de supervivencia libre de progresión (PFS) en terapia de primera línea fue de 10.3 meses (95% CI 6.3-14.3 meses). Al analizar entre expresiones negativas y

positivas de CD47, en análisis univariado, PFS casi alcanza una significancia estadística para un mejor resultado positivo en el grupo de PFS (tabla 2; figura 2(a)).

Tabla 2. Análisis univariado y multivariado de factores asociados con la PFS

		Median, 95% CI	Progression-free survival		
			<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>
Gender	Female	18.2 (0-43.1)	0.067		
	Male	7.7 (4.9-10.5)			
Age	<60 years	10.3 (5.9-14.7)	0.415		
	≥60 years	18.8 (0.4-37.2)			
Tobacco smokers	Nonsmoker	27.3 (3.0-51.7)	0.163		
	Smoker	6.2 (3.8-8.6)			
ECOG PS	0-1	10.3 (0-20.9)	0.393		
	2+	4.6 (N/R)			
Disease stage	IIIB	N/R (N/R)	0.002	1.6 (0.7-4.0)	0.237
	IV	6.5 (4.3-8.6)			
Histological subtype	Carcinoid	NA			
	Atypical				
	Large cell				
Lung metastases	Absent	10.3 (0.2-20.4)	0.349		
	Present	3.4 (1.1-5.7)			
Bone metastases	Absent	7.8 (1.2-14.4)	0.579		
	Present	10.3 (3.6-17.0)			
Pleural effusion	Absent	16.9 (4.1-29.7)	<0.001	9.4 (2.3-38.5)	0.02
	Present	3.4 (0.0-6.8)			
CNS metastases	Absent	16.9 (6.8-27.1)	0.033	5.2 (1.4-19.3)	0.013
	Present	6.5 (4.3-8.6)			
Liver metastases	Absent	15.7 (0.0-32.3)	0.018	3.1 (1.0-9.6)	0.047
	Present	6.0 (0.0-11.9)			
Adrenal metastases	Absent	10.3 (3.4-17.2)	0.593		
	Present	7.8 (7.6-8.1)			
CD47	Negative	7.8 (4.9-10.7)	0.059	0.7 (0.2-2.5)	0.620
	Positive	45.7 (0.0-115.3)			

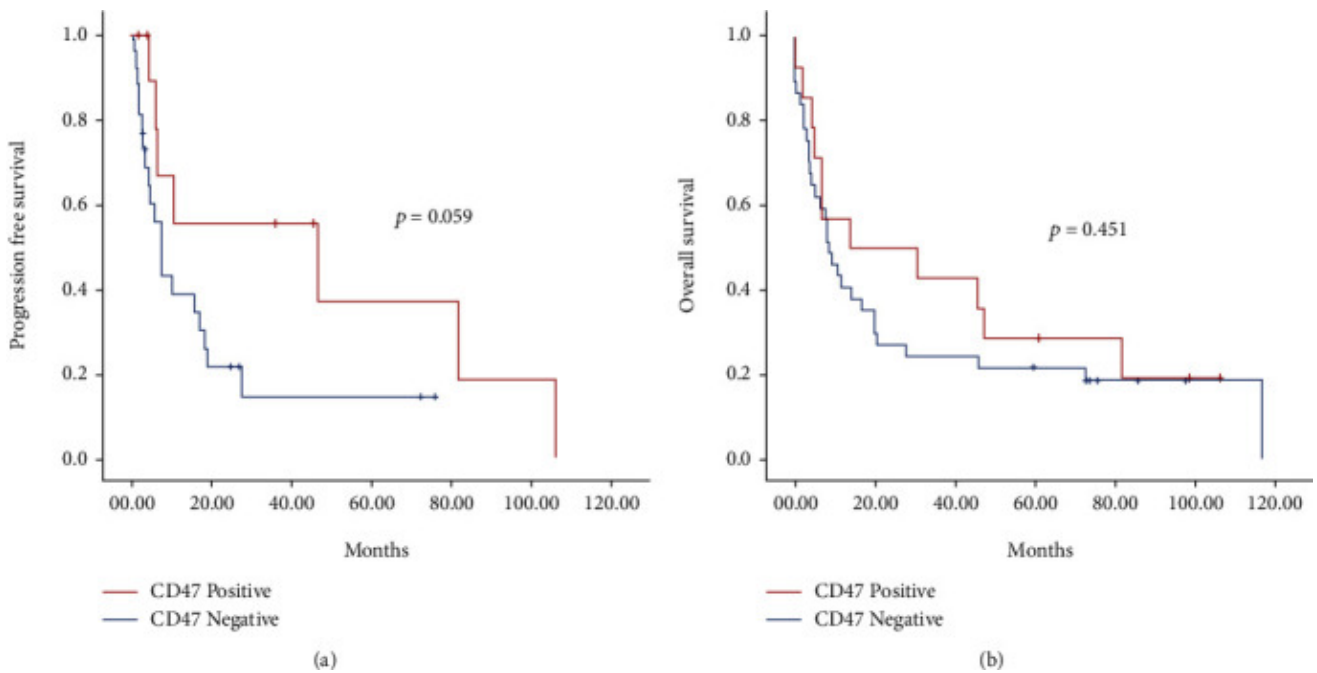


Figura2. PFS (a) y OS (b) según la expresión de CD47 de toda la población.

Al analizar la PFS, encontramos que el género masculino con historial de tabaquismo, enfermedad en grado IV, fluido pleural, metástasis en Sistema Nervioso Central y metástasis de hígado estaban asociadas con menores cantidades de tasa de supervivencia (OS).

Por otro lado, la histología de subtipo atípica fue asociada a un mejor OS (tabla 3). Cuando se divide la cohorte de acuerdo con la expresión negativa o positiva de CD47 no se encontraron diferencias significativas entre grupos ($p= 0.451$) (figura 2(b)).

Tabla 3. **Análisis univariado y multivariado de factores asociados a OS.**

		Median, 95% CI	Overall survival		
			<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>
Gender	Female	14.1 (0.0-29.3)	0.012	0.8 (0.3-1.9)	0.695
	Male	5.1 (0.0-11.8)			
Age	<60 years	8.0 (3.8-12.1)	0.801		
	≥60 years	14.0 (1.9-26.0)			
Tobacco smokers	Nonsmoker	19.7 (0.1-39.4)	0.036	1.7 (0.7-4.2)	0.233
	Smoker	7.6 (4.5-10.7)			
ECOG PS	0-1	16.6 (7.6-25.6)	<0.001	11.1 (3.8-32.1)	<0.001
	2+	3.5 (1.1-5.9)			
Disease stage	IIIB	71.5 (N/R)	0.001	1.2 (0.7-2.2)	0.429
	IV	6.9 (4.1-9.8)			
Histological subtype	Carcinoid	N/R (N/R)	0.003	1.3 (0.8-2.0)	0.225
	Atypical	30.4 (5.6-55.2)			
	Large cell	6.9 (2.6-11.3)			
	Small cell	6.8 (1.2-12.5)			
Lung metastases	Absent	10.8 (2.9-18.7)	0.961		
	Present	6.9 (2.3-11.6)			
Bone metastases	Absent	8.0 (5.9-10.8)	0.751		
	Present	14.0 (2.8-25.2)			
Pleural effusion	Absent	14.1 (1.6-26.6)	0.003	3.2 (1.1-9.0)	0.026
	Present	6.9 (2.3-11.6)			
CNS metastases	Absent	19.7 (6.8-32.7)	0.010	2.7 (1.1-6.5)	0.028
	Present	5.1 (2.7-7.6)			
Liver metastases	Absent	14.0 (3.1-24.8)	0.029	2.6 (1.0-6.6)	0.038
	Present	6.4 (0.0-14.4)			
Adrenal metastases	Absent	8.0 (4.9-11.0)	0.798		
	Present	11.6 (4.7-18.6)			
CD47	Negative	8.4 (4.6-12.3)	0.451	0.835 (0.3-1.9)	0.677
	Positive	14.0 (0.0-57.0)			

Pronóstico en pacientes positivos a CD47 y Ki-67≥40%.

En un subanálisis, encontramos que en pacientes con tumores de alto grado (definidos como Ki-67 > 40 %), la expresión positiva de CD47 se asoció fuertemente con una PFS disminuida, siendo 4,83 (IC del 95 % 1,59-8,06) para la expresión negativa Grupo CD47 vs. 45,8 (IC 95% 0,0-126,4) para el grupo CD47 positivo.

Sin embargo, estas diferencias fueron estadísticamente significantes al analizar la OS (6,43 (IC 95% 2,65-10,22) para el grupo CD47 negativo vs. 6,99 (IC 95% 0,0-16,64) para el grupo CD47 positivo) (Figura 3).

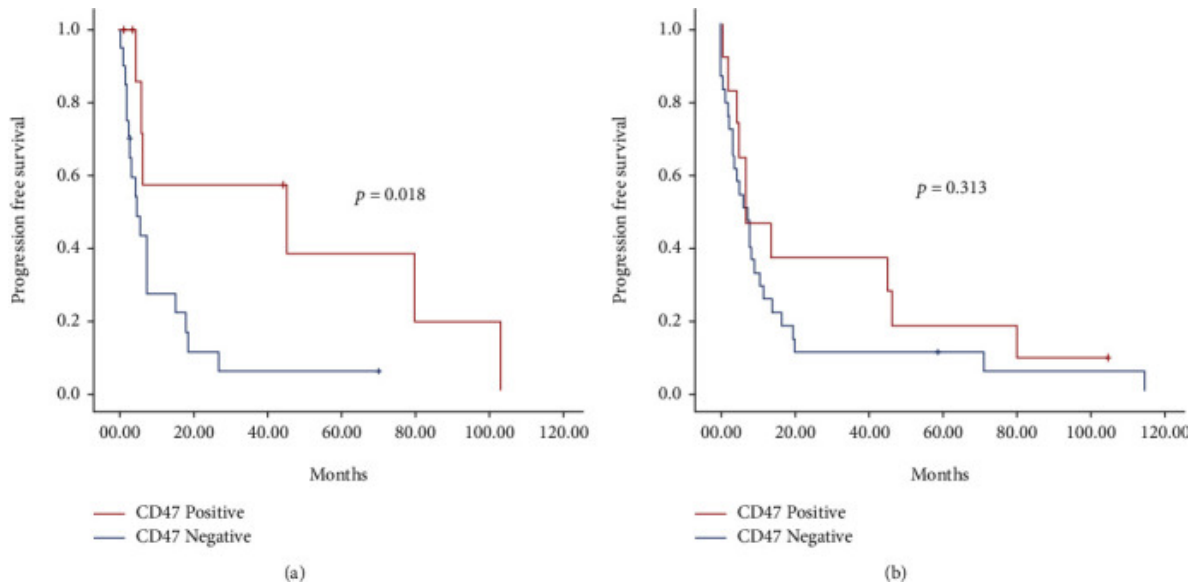


Figura 3. **PFS (a) y OS (b) según la expresión de CD47 en pacientes con KI-67 $\geq 40\%$.**

DISCUSIÓN

LNET es un grupo heterogéneo asociado con un pronóstico pobre y un tratamiento de opciones limitadas; además, hay pocos marcadores inmunológicos útiles para la predicción a la respuesta del tratamiento y pronóstico. Algunos LNET, como los SCLC, muestran alta inmunogenicidad, una carga de mutación alta y otros factores que los hacen favorables a la inmunoterapia lo que convierte a los puntos de control inmunitarios un posible descubrimiento en el tratamiento de SCLC y otros tumores neuroendocrinos [8].

LNET está clasificado en cuatro variantes histológicas apodadas: TC, AC, LCNEC y SCLC. TC y AC mostraron modificaciones en la tasa de mutación somática y alteraciones en diversas vías genéticas que las hacen molecularmente distintas de SCLC y LCNEC y diferentes subconjuntos de pacientes existen con cada variante de LNET [4].

Por ejemplo, SCLC puede ser subcategorizado en: neuroendocrino alto y neuroendocrino bajo con diferentes microambientes inmunológicos, los tumores neuroendocrinos altos están caracterizados por tener niveles bajos de infiltración de células inmunes; mientras tanto los tumores neuroendocrinos bajos están asociados en niveles altos de expresión de ARN relacionado con células inmunitarias. Por lo tanto, los pacientes con tumores neuroendocrinos bajos tienen probabilidad de

responder a inmunoterapias [22]. Además de la presencia de una población heterogénea compuesta por células inmunitarias innatas y células inmunes adaptativas, la expresión de puntos de control inmunes son también un factor crucial en la inmunosupresión en tumores LNET. Los tumores SCLC presentan niveles de ARN para marcadores de macrófagos (incluyendo SIRP α), y su análisis demostró una asociación positiva entre la infiltración de macrófagos y el estadio tumoral [23].

Las células cancerígenas pueden escapar de la vigilancia inmunitaria de los macrófagos por la expresión de la regulación de CD47 la cual bloquea la respuesta inmune innata [19-24], esta teoría hace que la inhibición de CD47 sea una estrategia de tratamiento favorable para pacientes con LNET [23]. La expresión del RNAm de CD47 fue confirmada en células humanas de SCLC, líneas celulares de SCLC y tumores xenoinjertados [23, 25, 26].

De acuerdo a lo reportado, no hay información acerca de la expresión en TC, AC y LNET. Por lo tanto, aún no está determinado el rol que ejerce CD47 en estos tumores. El objetivo del presente estudio era evaluar a CD47 como un biomarcador de pronóstico en 51 pacientes con LNET. Se confirmó la expresión de CD47 en el 25-7% de nuestros pacientes con LNET. La expresión de CD47 fue evidente en el 25 % de los tumores carcinoides, el 25 % de los atípicos, el 40 % de los tumores de células grandes y el 24 % de los tumores de células pequeñas. A pesar de las expectativas iniciales, encontramos que los pacientes con un Ki67>67% y expresión positiva de CD47 tenían un PFS mejor (45.7 contra 7.8 meses; $p= 0.058$). Cuando se comparan las expresiones de CD47 entre NSCLC y LNET es evidente que CD47 es poco expresado en LNET (84% vs. 27.5%) [27].

En nuestro estudio usamos el índice de etiquetado de Ki-67 para clasificar las muestras en dos categorías: de grado bajo (TC y AC) y de alto grado (LCNEC y SCLC) (28). Como se esperaba los pacientes con grado bajo de LNET mostraron mejor PFS y OS que los pacientes con alto grado de LNET. Curiosamente, los pacientes con un alto grado de LNET y expresión positiva de CD47 mostraron mejor PFS; bajo nuestro conocimiento, esta observación nunca ha sido reportada en cáncer de pulmón. Esta "paradoja" puede ser explicada por vías reguladas por CD47 distintas a SIRP. Sin embargo, una explicación confiable definitiva de como la expresión alta de CD47 en LNET puede estar asociada con mejor PFS y OS aún necesita ser investigada. Se ha reportado que en bastantes tumores malignos incluyendo NSCLC, el aumento de la expresión de CD47 está asociada con un peor pronóstico [27]. El mecanismo fisiopatológico de esta asociación parece razonable, puesto que niveles altos de CD47 inhibirán de manera más eficiente SIRP α en macrófagos por lo tanto el tumor evitará la respuesta inmune innata. Sin embargo, se ha reportado que CD47 también regula otras vías extracelulares, de membrana y otras intracelulares. El efecto de inhibición de CD47 en vías de señalización,

además de SIRP α , es un campo menos estudiado y puede ser diferente de acuerdo con el tipo de tumor [26]. Por ejemplo, CD47 puede también interactuar con la trombospondina-1 (TSP-1), el cual es un ligando extracelular secretado por células vasculares e inflamatorias; TSP-1 regula la motilidad celular, proliferación y diferenciación de algunas líneas celulares de tumores *in vitro* [29]. La unión de TSP-1 a CD47 inhibe la angiogénesis, induce varias vías de muerte y modifica la respuesta inmune. La unión de CD47 por TSP-1 inhibe la activación de la guanilil cilclasa soluble, previene la activación de VEGFR2 y suprime vías proangiogénicas dependientes de NO [30,31]. Además, la señalización de TSP1 a través de CD47 mejora las funciones angiogénicas y aumenta la expresión de los promotores del ciclo celular [32]. En las células de cáncer de próstata la falta de CD47 o el bloqueo de la transmisión TSP-1/CD47 promueve la angiogénesis y mejora la integridad vascular, llevando a un progreso acelerado del tumor [33]. Además, la incubación de las células de cáncer de mama con un péptido agonista de CD47 (4N1K) derivado de TSP-1 induce la apoptosis de forma dependiente de la dosis [34]. En las células SCLC, TSP-1 participa en una adhesión de integrina $\alpha 3 \beta 1$ y en la diferenciación similar a las neuritas y previene su proliferación [35]. Además, TSP-1 tiene un papel en la respuesta inmune; la unión de TSP-1 a CD47 promueve el reclutamiento de macrófagos, induce la adhesión de células T y actúa como un regulador negativo autocrino para la activación de células dendríticas [36-38]. Por lo tanto, una expresión aumentada de CD47, como encontramos en este trabajo, podría promover la señalización de TSP-1-CD47, inhibir la angiogénesis, desencadenar la apoptosis de las células tumorales y modular la respuesta inmune para promover el reclutamiento de macrófagos. Los resultados de este estudio no revelaron una correlación entre la expresión de CD47 y el mal pronóstico de los pacientes con LNET. Asimismo, el portal Human Protein Atlas), un programa con sede en Suecia iniciado en 2003 con el objetivo de cartografiar todas las proteínas humanas en células, tejidos y órganos, mostró que los niveles de ARN de CD47 podrían ser un marcador de pronóstico favorable para la supervivencia de pacientes con carcinoma papilar de tiroides. El portal presenta un gráfico de dispersión de supervivencia interactivo y un análisis de supervivencia utilizando datos del Atlas del Genoma del Cáncer (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000196776-CD47/pathology/thyroid+cancer>). Se clasificó a los pacientes en dos grupos de expresión ("baja" y "alta") y se examinó la correlación entre los niveles de expresión y la supervivencia de los pacientes. Curiosamente, los pacientes con una expresión elevada de CD47 presentaron tasas de supervivencia más elevadas que los pacientes con una expresión baja de CD47. Curiosamente, los tumores papilares tiroideos muestran tinción focal para marcadores neuroendocrinos como la cromogranina A y la sinaptofisina. [39-40].

Estos datos sugieren que las alteraciones hormonales como las que presentan los LNET y las células endocrinas productoras de hormonas podrían tener un efecto específico en la función de CD47. Las limitaciones de nuestro estudio son muchas y deben tenerse en cuenta antes de sacar conclusiones. En primer lugar, la naturaleza retrospectiva de nuestro trabajo es una desventaja significativa. En segundo lugar, aún no se ha determinado un punto de corte fiable para evaluar la expresión de CD47. En tercer lugar, no evaluamos si CD47 era un biomarcador de respuesta a fármacos anti-CD47, como magrolimab (Gilead Sciences); por lo tanto, sigue existiendo la posibilidad de que CD47 sea un biomarcador útil para predecir la respuesta a la inmunoterapia y esto debería evaluarse más a fondo mediante ensayos prospectivos. En cuarto lugar, la falta de suficiente tejido tumoral nos limitó para analizar el infiltrado de células tumorales. Debido a las limitaciones de nuestro estudio, consideramos que nuestros resultados deben confirmarse mediante ensayos más amplios, idealmente prospectivos.

CONCLUSIONES

Contrario a lo que sucede en una amplia gama de tumores sólidos y hematológicos, una mayor expresión de CD47 en pacientes con LNET está asociada con una mayor supervivencia libre de progresión, especialmente en pacientes con un Ki-67 \geq 40%. El papel real del eje CD47 y SIRP α -CD47 α -TSP-1 aún debe ser explicado en LNET.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. S. Ettinger, "Overview and state of the art in the management of lung cancer," *Oncology* (Williston Park, N.Y.), vol. 18, no. 4, pp. 3–9, 2004.
- [2] W. D. Travis, "Pathology and diagnosis of neuroendocrine tumors: lung neuroendocrine," *Thoracic Surgery Clinics*, vol. 24, no. 3, pp. 257–266, 2014.
- [3] G. Rindi, D. S. Klimstra, B. Abedi-Ardekani et al., "A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal," *Modern Pathology*, vol. 31, no. 12, pp. 1770–1786, 2018.
- [4] G. Pelosi, G. Rindi, W. D. Travis, and M. Papotti, "Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 9, no. 3, pp. 273–284, 2014.
- [5] G. Pelosi, A. Sonzogni, S. Harari et al., "Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights," *Transl Lung Cancer Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 513–529, 2017.

- [6] N. Rekhtman, P. Desmeules, A. M. Litvak et al., "Stage IV lung carcinoids: spectrum and evolution of proliferation rate, focusing on variants with elevated proliferation indices," *Modern Pathology*, vol. 32, no. 8, pp. 1106–1122, 2019.
- [7] Soto-Pantoja D.R., Terabe M., Ghosh A., Ridnour L.A., DeGraff W.G., Wink D.A., Berzofsky J.A., Roberts D.D. CD47 in the tumor microenvironment limits cooperation between antitumor T-cell immunity and radiotherapy. *Cancer Res.* 2014;74:6771–6783. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0037-T.
- [8] M. E. Caplin, E. Baudin, P. Ferolla et al., "Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids," *Annals of Oncology*, vol. 26, no. 8, pp. 1604–1620, 2015.
- [9] Y. Wu, Y. Liu, C. Sun et al., "Immunotherapy as a treatment for small cell lung cancer: a case report and brief review," *Transl Lung Cancer Res.*, vol. 9, no. 2, pp. 393–400, 2020.
- [10] I. Maggio, L. Manuzzi, G. Lamberti, A. D. Ricci, N. Tober, and D. Campana, "Landscape and future perspectives of immunotherapy in neuroendocrine neoplasia," *Cancers (Basel)*., vol. 12, no. 4, p. 832, 2020.
- [11] D. J. Pinato, A. Vallipuram, J. S. Evans et al., "Programmed cell death ligand expression drives immune tolerogenesis across the diverse subtypes of neuroendocrine tumours," *Neuroendocrinology*, vol. 111, no. 5, pp. 465–474, 2021.
- [12] R. Feng, H. Zhao, J. Xu, and C. Shen, "CD47: the next checkpoint target for cancer immunotherapy," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 152, p. 103014, 2020.
- [13] E. Sick, A. Jeanne, C. Schneider, S. Dedieu, K. Takeda, and L. Martiny, "CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest," *British Journal of Pharmacology*, vol. 167, no. 7, pp. 1415–1430, 2012.
- [14] M. P. Chao, C. Tang, R. K. Pachynski, R. Chin, R. Majeti, and I. L. Weissman, "Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy," *Blood*, vol. 118, no. 18, pp. 4890–4901, 2011.
- [15] D. Kim, J. Wang, S. B. Willingham, R. Martin, G. Wernig, and I. L. Weissman, "Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells," *Leukemia*, vol. 26, no. 12, pp. 2538–2545, 2012.

- [16] J. Yuan, X. Shi, C. Chen et al., “High expression of CD47 in triple negative breast cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis,” *Oncology Letters*, vol. 18, no. 3, pp. 3249–3255, 2019.
- [17] H. Zhao, J. Wang, X. Kong et al., “CD47 promotes tumor invasion and metastasis in non-small cell lung cancer,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 29719, 2016.
- [18] A. Nigro, L. Ricciardi, I. Salvato et al., “Enhanced expression of CD47 is associated with off-target resistance to tyrosine kinase inhibitor gefitinib in NSCLC,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, p. 3135, 2020.
- [19] A. D. Michaels, T. E. Newhook, S. J. Adair et al., “CD47 blockade as an adjuvant immunotherapy for resectable pancreatic cancer,” *Clinical Cancer Research*, vol. 24, no. 6, pp. 1415–1425, 2018.
- [20] R. Catalán, M. Orozco-Morales, N. Y. Hernández-Pedro et al., “CD47-SIRP α axis as a biomarker and therapeutic target in cancer: current perspectives and future challenges in nonsmall cell lung cancer,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2020, Article ID 9435030, 8 pages, 2020.
- [21] R. Advani, I. Flinn, L. Popplewell et al., “CD47 blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin’s lymphoma,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 379, no. 18, pp. 1711–1721, 2018.
- [22] B. I. Sikic, N. Lakhani, A. Patnaik et al., “First-in-human, first-in-class phase I trial of the anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 in patients with advanced cancers,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 37, no. 12, pp. 946–953, 2019.
- [23] D. Dora, C. Rivard, H. Yu et al., “Neuroendocrine subtypes of small cell lung cancer differ in terms of immune microenvironment and checkpoint molecule distribution,” *Molecular Oncology*, vol. 14, no. 9, pp. 1947–1965, 2020.
- [24] K. Weiskopf, N. S. Jahchan, P. J. Schnorr et al., “CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, no. 7, pp. 2610–2620, 2016.
- [25] P. Sharma and J. P. Allison, “The future of immune checkpoint therapy,” *Science*, vol. 348, no. 6230, pp. 56–61, 2015.
- [26] N. Pedersen, S. Mortensen, S. B. Sørensen et al., “Transcriptional gene expression profiling of small cell lung cancer cells,” *Cancer Research*, vol. 63, no. 8, pp. 1943–1953, 2003.

- [27] L. Liu, L. Zhang, L. Yang et al., "Anti-CD47 antibody as a targeted therapeutic agent for human lung cancer and cancer stem cells," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, p. 404, 2017.
- [28] O. Arrieta, A. Aviles-Salas, M. Orozco-Morales et al., "Association between CD47 expression, clinical characteristics and prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer," *Cancer Medicine*, vol. 9, no. 7, pp. 2390–2402, 2020.
- [29] S. Naheed, C. Holden, L. Tanno et al., "The utility of Ki-67 as a prognostic biomarker in pulmonary neuroendocrine tumours: protocol for a systematic review and meta-analysis," *BMJ Open*, vol. 9, no. 8, article e031531, 2019.
- [30] T. Huang, L. Sun, X. Yuan, and H. Qiu, "Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression," *Oncotarget*, vol. 8, no. 48, pp. 84546–84558, 2017.
- [31] J. S. Isenberg, Y. Jia, J. Fukuyama, C. H. Switzer, D. A. Wink, and D. D. Roberts, "Thrombospondin-1 inhibits nitric oxide signaling via CD36 by inhibiting myristic acid uptake," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 21, pp. 15404–15415, 2007.
- [32] S. Kaur, G. Martin-Manso, M CD47, " *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 50, pp. 38923 –38932, 2010.
- [33] Q. Gao, K. Chen, L. Gao, Y. Zheng, and Y. G. Yang, "Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits cell cycle progression and induces senescence in endothelial cells," *Cell Death & Disease*, vol. 7, no. 9, article e2368, 2016.
- [34] L. Gao, K. Chen, Q. Gao, X. Wang, J. Sun, and Y. G. Yang, "CD47 deficiency in tumor stroma promotes tumor progression by enhancing angiogenesis," *Oncotarget*, vol. 8, no. 14, pp. 22406 –22413, 2017.
- [35] P. P. Manna and W. A. Frazier, "CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A," *Cancer Research*, vol. 64, no. 3, pp. 1026 –1036, 2004.
- [36] N. Guo, N. S. Templeton, H. al-Barazi et al., "Thrombospondin-1 promotes alpha3beta1 integrin-mediated adhesion and neurite-like outgrowth and inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells," *Cancer Research*, vol. 60, no. 2, pp. 457 –466, 2000.
- [37] J. S. Isenberg, J. B. Maxhimer, P. Powers, M. Tsokos, W. A. Frazier, and D. D. Roberts, "Treatment of liver ischemiareperfusion injury by limiting thrombospondin-1/CD47 signaling," *Surgery*, vol. 144, no. 5, pp. 752–761, 2008.

[38] M. Sarfati, G. Fortin, M. Raymond, and S. Susin, "CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP-alpha reverse signaling, " *Current Drug Targets*, vol. 9, no. 10, pp. 842 –850, 2008.

[39] C. E. Demeure, H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati, "CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 4, pp. 2193 –2199, 2000.

[40] Z. W. Baloch and V. A. LiVolsi, "Neuroendocrine tumors of the thyroid gland, " *American Journal of Clinical Pathology* , vol. 115, pp. S56 –S67, 2001