



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Programa de doctorado: Bioquímica y Biomedicina

**ANÁLISIS DE MEDIADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN  
ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO: DETERMINACIÓN DE SU VALOR COMO  
BIOMARCADORES**

**TESIS DOCTORAL** presentada por:

Elena Sanmartín García

**Dirigida por:**

Dr. Carlos Camps Herrero

Dra. Eloisa Jantus Lewintre

Dr. Rafael Sirera Pérez

Valencia, 2012





VNIVERSITAT ID VALÈNCIA  
Departament de Medicina

**CARLOS CAMPS HERRERO**  
Profesor titular  
Departamento de Medicina  
Universitat de València

**INFORMA:**

Que Dña. Elena Sanmartín García, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **“ANÁLISIS DE MEDIADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO: DETERMINACIÓN DE SU VALOR COMO BIOMARCADORES”**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

En Valencia, a 25 de Septiembre de 2012.

---

Prof. **Carlos Camps Herrero**  
DNI: 22517012N





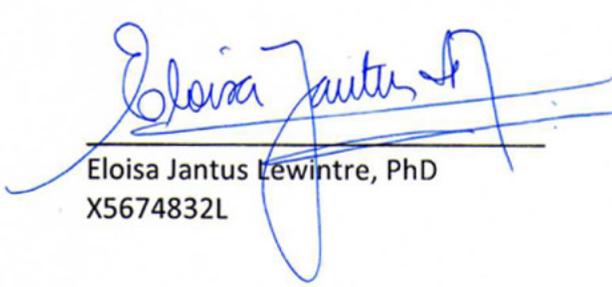
**FUNDACIÓ**  
INVESTIGACIÓ  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA

**Eloisa Jantus Lewintre**  
Licenciada en Bioquímica  
Doctora por la Universidad de Valencia

**INFORMA:**

Que Dña. Elena Sanmartín García, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **"ANÁLISIS DE MEDIADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO: DETERMINACIÓN DE SU VALOR COMO BIOMARCADORES"**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

En Valencia, a 25 de Septiembre de 2012.



Eloisa Jantus Lewintre, PhD  
X5674832L





**Rafael Sirera Pérez**  
Licenciado en Biología  
Doctor por la Universidad de Valencia

**INFORMA:**

Que Dña. Elena Sanmartín García, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **“ANÁLISIS DE MEDIADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO: DETERMINACIÓN DE SU VALOR COMO BIOMARCADORES”**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

En Valencia, a 25 de Septiembre de 2012.

Rafael Sirera Pérez  
22.695.2796-A



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mis agradecimientos a todas las personas que han contribuido a que esta tesis doctoral haya sido posible.

En primer lugar, a mis directores:

Al Dr. Carlos Camps, por permitirme formar parte de su gran equipo de trabajo, por su experiencia, sus consejos y su exigencia, porque siempre nos ha motivado a aprender y a superarnos.

Al Dr. Rafael Sirera, por iniciarme en el mundo de la investigación, por su inestimable ayuda y sus enseñanzas, por confiar en mí y por su espíritu crítico.

A la Dra. Eloisa Jantus, por todo su tiempo, dedicación y profesionalidad, por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo, y por todo lo mucho que he aprendido junto a ella. Gracias, porque sin tu ayuda no habría sido posible llevar a término esta tesis.

Al Servicio de Oncología Médica del Hospital General de Valencia, tanto médicos adjuntos, como residentes, *data managers*, enfermeras, etc. Por toda su ayuda y por su importante labor y dedicación. Agradecer también a los pacientes que donaron sus muestras voluntariamente para investigación. Así como a todo el personal del hospital que ha contribuido de alguna manera en este trabajo.

A todos los compañeros de la Fundación de Investigación, los que son y los que han pasado por allí durante estos años, con los que he compartido experiencias, anécdotas y risas. Gracias por el buen ambiente de trabajo y porque siempre que lo he necesitado, me habéis prestado vuestra ayuda.

A Marta y a Sandra (“las *Oncogirls*”), mis compañeras de laboratorio y amigas. Por ayudarme siempre, por vuestro cariño y complicidad, y por haber pasado tan buenos ratos juntas. Me habéis hecho el camino más fácil.

Por supuesto, gracias también a Rut y Lydia, con las que he compartido esta última etapa. Por todo lo que me habéis ayudado y por haberme transmitido siempre ese optimismo.

Pasando al terreno personal, en primer lugar, me gustaría expresar un agradecimiento muy especial a mis padres Alfredo y Mari Carmen, y a mi hermana Esther. Por confiar en mí, por vuestro apoyo, porque siempre me habéis escuchado y animado y habéis dado todo por mí. Desde luego, también gracias al resto de mi familia, por el cariño y aliento que me dais. Y no puedo olvidarme de Amparo y Tomás, Vicente y Amparín, gracias por todo vuestro afecto. Os quiero a todos.

Y para finalizar, me gustaría dar las gracias a mis amigos, en particular a los de siempre: Susana, Lorena, Raquel, Eva, Alfredo y Mónica; y también a Alicia y Jose. Por todos los buenos momentos que hemos vivido y los que nos quedan por vivir juntos. Os doy las gracias porque a vuestro lado consigo desconectar y relajarme y así todo resulta más fácil y llevadero. Y el agradecimiento más especial para Amparo. Porque has vivido paso a paso todo el proceso, eres mi gran confidente y me comprendes mejor que nadie. Gracias por ser como eres y por estar siempre a mi lado.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	15
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	19
1. Concepto de cáncer	21
2. Cáncer de pulmón	21
2.1. Epidemiología	21
2.2. Factores de riesgo	22
2.3. Clasificación anatomopatológica	23
2.4. Detección temprana	25
2.5. Diagnóstico y estadificación	27
2.6. Tratamiento	31
3. Biología molecular del cáncer de pulmón	33
3.1. Características moleculares del cáncer	33
3.2. Alteraciones moleculares en cáncer de pulmón	36
3.3. Clasificación molecular del cáncer de pulmón	41
4. Neovascularización tumoral	42
4.1. Vasculogénesis	42
4.2. Angiogénesis	43
4.3. Linfangiogénesis	46
5. Factores estimuladores e inhibidores de la angiogénesis y linfangiogénesis	48
5.1. Respuesta fisiológica a la hipoxia y el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF)	48
5.2. Familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	49
5.2.1. Ligandos de VEGF	51
5.2.2. Receptores de VEGF	57
5.3. Neuropilinas (NRP)	59
6. Terapias antiangiogénicas	59
7. Biomarcadores	61
7.1. Biomarcadores en angiogénesis y linfangiogénesis	62
8. Objetivos	64
<b>II. METODOLOGÍA</b>	65
1. Pacientes y controles	67
1.1. Cohorte A: pacientes con CPNM en estadios avanzados	67
1.2. Cohorte B: pacientes con CPNM en estadios iniciales	67
1.3. Grupo control	68

2.	Muestras a estudiar.....	68
2.1.	Sangre periférica: plasma.....	68
2.2.	Muestras de tejido pulmonar.....	69
3.	Inmunoensayos para la determinación de VEGF-A y sVEGFR-2.....	69
4.	Extracción de ARN y ADN a partir de muestras titulares.....	71
5.	Determinación del estado mutacional del gen <i>EGFR</i> .....	71
6.	Transcripción reversa.....	73
7.	PCR cuantitativa a tiempo real.....	74
8.	Inmunoblot.....	77
9.	Análisis estadístico de los datos.....	79
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.....</b>	<b>81</b>
1.	Capítulo I. Marcadores solubles.....	83
1.1.	Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de la población.....	83
1.1.1.	Cohorte A: pacientes con CPNM en estadios avanzados.....	83
1.1.2.	Cohorte B: pacientes con CPNM en estadios iniciales.....	84
1.1.3.	Grupo control sano.....	85
1.2.	Niveles plasmáticos de VEGF-A y sVEGFR-2.....	86
1.3.	Correlación con las características clínico-patológicas.....	91
1.3.1.	Cohorte A: pacientes con CPNM en estadios avanzados.....	91
1.3.2.	Cohorte B: pacientes con CPNM en estadios iniciales.....	92
1.4.	Análisis del valor pronóstico de los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2.....	93
1.4.1.	Cohorte A: pacientes con CPNM en estadios avanzados.....	93
1.4.2.	Cohorte B: pacientes con CPNM en estadios iniciales.....	100
2.	Capítulo II. Marcadores tisulares.....	105
2.1.	Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de la población.....	105
2.2.	Análisis del estado mutacional del gen <i>EGFR</i> en muestras tumorales.....	106
2.3.	Cuantificación y valoración de la calidad el ARN.....	107
2.4.	Cálculo de las eficiencias de la amplificación y linealidad.....	108
2.5.	Cuantificación de los niveles de expresión génica relativa.....	109
2.6.	Correlación con las características clínico-patológicas.....	111
2.7.	Análisis del valor pronóstico del estudio de expresión de genes angiogénicos/linfangiogénicos.....	113

2.7.1. Análisis del valor pronóstico de los marcadores de manera individual.....	113
2.7.2. Análisis del valor pronóstico de los marcadores combinados.....	121
2.7.3. Análisis multivariante de Cox.....	127
2.7.4. Búsqueda de una firma genética asociada con mal pronóstico.....	129
2.8. Análisis de proteínas mediante Inmunoblot.....	133
3. Integración de resultados.....	136
<b>IV. CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>141</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>145</b>
<b>VI. ANEXOS.....</b>	<b>165</b>
1. Dictámenes: Comisión de Investigación y Comité Ético de Investigación Clínica.....	167
2. Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales.....	173
3. Publicaciones derivadas de la tesis doctoral.....	175



## **ABREVIATURAS**

**ACTB:** *Actin beta*. Beta-actina.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** ADN complementario.

**ALK:** *Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*. Receptor tirosina quinasa de linfoma anaplásico.

**ANG:** Angiopoyetina.

**AP-1:** *Activator protein 1*. Proteína de activación 1.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**AUC:** *Area under curve*. Área bajo la curva.

**BSA:** *Bovine serum albumin*. Seroalbúmina bovina.

**CEA:** *Carcinoembryonic antigen*. Antígeno carcinoembrionario.

**CMP:** Cáncer microcítico de pulmón.

**CPNM:** Cáncer de pulmón no microcítico.

**Cq:** *Quantification cycle*. Ciclo de cuantificación.

**CYFRA:** *Cytokeratin-19 fragment*. Citoqueratina 19.

**E:** Eficiencia.

**EDTA:** *Ethylen diamine tetraacetil acid*. Ácido etilendiaminotetraacético.

**EGF:** *Epidermal growth factor*. Factor de crecimiento epidérmico

**EGFR:** *Epidermal growth factor receptor*. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

**ELISA:** *Enzyme-linked immunosorbent assay*. Ensayo inmunosorbente ligado a enzima.

**EML4:** *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4*. Proteína equinoderma asociada a microtubulos 4.

**FAM:** *Fluorescein amidite*. 6-carboxifluoresceína.

**FGF:** *Fibroblast growth factor*. Factor de crecimiento de fibroblastos.

**GUSB:** *Glucuronidase beta*. Beta-glucuronidasa.

**HIF:** *Hypoxia inducible factor*. Factor de transcripción inducible por hipoxia.

**ICAM-1:** *Intercellular Adhesion Molecule 1*. Molécula de adhesión intercelular 1.

**KRAS:** *v-Ki-ras2 Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*.

**MAPK:** *Mitogen-activated protein kinases*. Proteína quinasa activada por mitógenos.

**MET:** *Hepatocyte growth factor receptor*. Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.

**MGB:** *Minor groove binder*. Unión al surco menor de DNA.

**MMP:** *Matrix metalloproteinase*. Metaloproteasa de matriz extracelular.

**MYC:** *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*. Oncogén homólogo de la mielocitomatosis viral.

**NA:** No alcanzada.

**NFκB:** *Nuclear factor kappa B*. Factor nuclear kappa B.

**NRP:** Neuropilina.

**PBS:** *Phosphate Buffer Saline*. Tampón fosfato salino.

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.

**PDGF:** *Platelet-derived growth factor*. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PDGFR:** *Platelet-derived growth factor receptor*. Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PET:** *Positron emission tomography*. Tomografía por emisión de positrones.

**PHD:** Prolil 4-hidroxilasa.

**PI3K:** *Phosphatidylinositol 3-kinase*. Fosfatidil-inositol 3-quinasa.

**PIGF:** *Placental growth factor*. Factor de crecimiento placentario.

**PS:** *Performance status*. Estado funcional.

**PTEN:** *Phosphatase and tensin homolog*. Homólogo de fosfatasa y tensina.

**RB1:** Retinoblastoma 1.

**RECIST:** *Response evaluation criteria in solid tumors*. Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos.

**RIN:** *RNA Integrity Number*. Número de integridad del ARN.

**ROC:** *Receiver operating curve*. Curva de característica operativa relativa.

**RT:** Retrotranscripción.

**RTqPCR:** *Real Time quantitative PCR*. PCR cuantitativa a tiempo real.

**SG:** Supervivencia global.

**TAMRA:** *Tetramethylrhodamine*. Tetrametilrodamina.

**TC:** Tomografía computarizada.

**TGF:** *Transforming growth factor*. Factor de crecimiento transformante.

**TIE2:** *Endothelium-specific receptor tyrosine kinase 2*. Receptor tirosina-quinasa 2 específico de endotelio.

**TK:** *Tirosine-kinase*. Tirosina-quinasa.

**TKI:** *TK Inhibitors*. Inhibidores TK.

**TLP:** Tiempo libre de progresión

**Tm:** *Melting temperatura*. Temperatura de fusión.

**VEGF:** *Vascular endothelial growth factor*. Factor de crecimiento del endotelio vascular.

**VEGFR:** *Vascular endothelial growth factor receptor*. Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular.



## I. INTRODUCCIÓN GENERAL



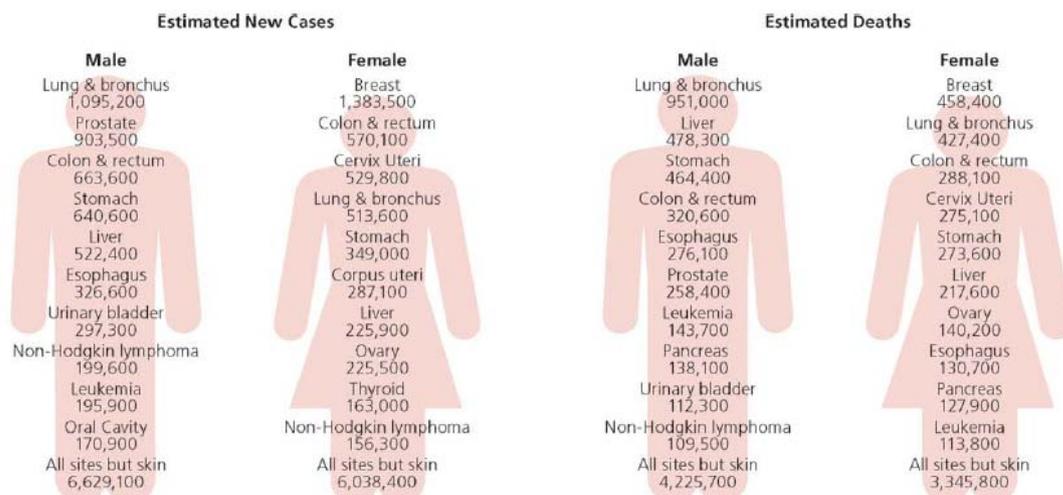
## 1. Concepto de cáncer

Bajo el nombre genérico de cáncer se engloban un conjunto de patologías que pueden afectar a distintos tipos de células y tejidos y que tienen en común el crecimiento descontrolado y desordenado de las células neoplásicas, las cuales pueden adquirir capacidad de desplazarse desde el tejido de origen hacia otros tejidos y órganos, en el proceso conocido como metástasis. La tumorigénesis es un proceso con varias etapas que implican cambios dinámicos en el genoma. Estos cambios liberan a las células cancerosas de los mecanismos homeostáticos que dirigen la proliferación normal y controlada (Hahn and Weinberg, 2002), confiriéndoles un tipo u otro de ventaja en el crecimiento, que les permiten adquirir características diferentes de las células normales.

## 2. Cáncer de pulmón

### 2.1. Epidemiología

El cáncer constituye un importante problema de salud pública, siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en países en vías de desarrollo. El cáncer de pulmón es el cáncer con los índices de mortalidad más elevados y el más comúnmente diagnosticado, con una incidencia a nivel mundial de más de un millón y medio de casos nuevos al año (Figura 1) (Jemal *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Estimación mundial de nuevos casos y muertes por cáncer en 2008 según los principales tipos de localización del cáncer (Jemal *et al.*, 2011)

Los datos disponibles sobre la incidencia y mortalidad por cáncer en Europa muestran que en el año 2008, se diagnosticaron alrededor 3.2 millones de casos nuevos de cáncer y que más de 1.7 millones de personas fallecieron como consecuencia de esta enfermedad. El cáncer de pulmón en Europa es el tercero en incidencia y el primero en niveles de mortalidad, representando la quinta parte del total de muertes por cáncer. El análisis por sexos muestra que sigue siendo el segundo cáncer más frecuente en los hombres y el tercero en las mujeres. La mortalidad por cáncer de pulmón en Europa en 2008 fue de 255300 hombres fallecidos y 86800 mujeres, lo que supone la principal causa de mortalidad por cáncer en hombres y la tercera en mujeres (Ferlay *et al.*, 2010). Además, la importancia del cáncer del pulmón radica también en su mal pronóstico, ya que a pesar de todos los avances tanto en el diagnóstico precoz como en la terapéutica, el índice de supervivencia media tras 5 años es aproximadamente del 15% (Youlden *et al.*, 2008).

## **2.2. Factores de riesgo**

El tabaquismo es el factor causal predominante en cáncer de pulmón, y de hecho se considera que los productos tóxicos del humo del tabaco son los responsables de aproximadamente el 85-90% de estos tumores (Freedman *et al.*, 2008). Un gran número de estudios han encontrado que los fumadores tienen un riesgo entre 15 y 30 veces mayor de desarrollar esta patología en comparación con los no fumadores. El riesgo aumenta en función de la intensidad y la duración de la exposición, esto es, en función del número de cigarrillos consumidos por día, el grado de inhalación, la edad de comienzo y el tipo de cigarrillos (Jemal *et al.*, 2008; Sasco *et al.*, 2004).

Por otra parte, el abandono del hábito tabáquico se ha asociado con una disminución progresiva del riesgo de padecer cáncer de pulmón. El riesgo relativo comienza a disminuir 2 o 3 años después de haber dejado de fumar y continúa disminuyendo durante los siguientes 10 años. Aunque el riesgo de los exfumadores no llegará a igualarse totalmente al de los no fumadores, pudiendo permanecer elevado durante más de treinta años, sigue siendo mucho más bajo que el de un fumador activo (Ebbert *et al.*, 2003; Peto *et al.*, 2000).

No obstante, de todas las personas que consumen tabaco, únicamente entre un 10-20 % acaban desarrollando un cáncer de pulmón. Esto sugiere la existencia de variaciones genéticas interindividuales de susceptibilidad y de predisposición, ya que entre familiares directos de enfermos de cáncer de pulmón se ha encontrado un riesgo superior de padecer esta enfermedad (Gorlova *et al.*, 2006; Matakidou *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 1996).

Respecto al tabaquismo pasivo, existen estudios epidemiológicos que indican que la exposición involuntaria al humo del tabaco incrementa el riesgo de padecer cáncer de pulmón. Estudios realizados con parejas donde uno de sus miembros era fumador activo y el otro no, indican que el riesgo de padecer cáncer de pulmón por el miembro no fumador puede incrementarse hasta un 30% (Bilello *et al.*, 2002; Hackshaw *et al.*, 1997; Hirayama, 2000; Lam, 2005).

Otros factores importantes que se han visto implicados en el desarrollo del cáncer de pulmón son las exposiciones a ciertos agentes carcinógenos como arsénico, asbesto, amianto (el carcinógeno ocupacional más relevante en España); algunos metales como níquel o cadmio; hidrocarburos policíclicos; radón o radiaciones ionizantes (Tyczynski *et al.*, 2003). Además, el riesgo de padecer cáncer de pulmón también parece incrementarse cuando se consume frecuentemente alcohol y dietas con un contenido alto de grasas totales, saturadas y colesterol (Bilello *et al.*, 2002).

En cuanto a factores protectores, parece ser que el tipo de dieta, sobretodo la rica en vitaminas, antioxidantes y carotenoides, y el ejercicio moderado pueden asociarse a cierta disminución del riesgo de cáncer de pulmón (Molina *et al.*, 2008).

### **2.3. Clasificación anatomopatológica**

La clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón se basa en técnicas histológicas y patológicas. La evaluación histológica se realiza sobre muestras de tejido de biopsia, obtenidas mediante broncoscopia, punciones o procedimientos quirúrgicos.

Existen cuatro tipos histológicos distintos de cáncer de pulmón: el carcinoma microcítico de pulmón o de célula pequeña (CMP) (20% de los casos), el carcinoma epidermoide (30%), el adenocarcinoma (35-40%) y el carcinoma de células grandes (alrededor de un 10%). Desde el punto de vista clínico, sin embargo, se reconocen básicamente dos tipos fundamentales en función de su comportamiento clínico y biológico: el carcinoma microcítico de pulmón, sensible a los agentes citotóxicos y no tratable quirúrgicamente; y el cáncer de pulmón no microcítico o de célula no pequeña (CPNM), que engloba a los otros tres subgrupos histológicos, y cuyo principal tratamiento es la cirugía si no existe diseminación (Travis, 2002).

El CMP se caracteriza por tener origen neuro-endocrino, estar compuesto por células pequeñas con escaso citoplasma y tener una localización peribronquial. Las células son redondeadas, ovas o fusiformes, con límites celulares mal definidos y muestran gránulos de neurosecreción en su citoplasma. Además presentan abundante necrosis y una alta tasa mitótica. Estos tumores tienen una evolución clínica muy agresiva y aparecen prácticamente en su totalidad en fumadores (Youlden *et al.*, 2008). Presenta un comportamiento peculiar, con un crecimiento rápido, una elevada capacidad de generar metástasis y una significativa respuesta al tratamiento con quimio y radioterapia. Sin embargo, la incidencia de recidiva en los dos primeros años es muy elevada (Travis, 2002).

Por el contrario, en el CPNM, las células tumorales son de mayor tamaño que las células pulmonares normales (de ahí su denominación), con citoplasma abundante y la localización suele ser periférica o central. Su comportamiento biológico es muy diferente al CMP. Es un tumor de crecimiento lento y que generalmente deriva del epitelio bronquial. Sus manifestaciones clínicas son muy variables en los primeros estadios, de modo que en un 50% de los casos diagnosticados, la enfermedad ya se encuentra en una fase avanzada. La sensibilidad a quimioterapia y radioterapia es baja.

- El subtipo epidermoide o carcinoma escamoso se origina en el epitelio de revestimiento y se localiza con frecuencia en los bronquios lobares o principales. Este subtipo está predominantemente vinculado al consumo de tabaco (Sakurai *et al.*, 2004).

- Los adenocarcinomas se originan en las células broncoalveolares, y su diferenciación es glandular, secretando mucina. Generalmente derivan de bronquios más distales, por lo que suelen ser tumores periféricos y afectan a la pleura. Es por este motivo que son los más frecuentemente operables. En general presentan un pronóstico peor que el subtipo epidermoide.
- El carcinoma de células grandes es el menos frecuente dentro de los CPNM y presenta un pronóstico similar al adenocarcinoma. Generalmente se localiza en la periferia del pulmón, pero pueden encontrarse también en localización central. En el examen macroscópico, a menudo aparecen como grandes tumores necróticos (Travis, 2002).

Recientemente se ha publicado una revisión de la clasificación histológica, que desde un enfoque multidisciplinar aporta algunos cambios a la clasificación empleada hasta la actualidad. Esta nueva guía modifica algunos conceptos y términos para subclassificar las diferentes variantes de adenocarcinoma de pulmón, excluyendo términos empleados hasta el momento, como el carcinoma broncoalveolar (BAC) o el subtipo mixto, e introduciendo nuevos conceptos, como el adenocarcinoma *in situ* (AIS), el carcinoma mínimamente invasivo (MIA) o el adenocarcinoma con crecimiento predominantemente lepidico (LPA). Se presenta como una guía para la clasificación histológica a partir de pequeñas biopsias y citologías, ya que el 70% de los cánceres de pulmón se diagnostican con muestras de este tipo. (Travis *et al.*, 2011).

## 2.4. Detección temprana

Durante la década entre los años 60 y 70, en un esfuerzo por determinar herramientas de detección que pudieran proporcionar un beneficio a largo plazo, se llevaron a cabo diversos ensayos controlados para evaluar la eficacia de la radiografía de tórax y/o citología de esputo en el cribado del cáncer de pulmón. Lamentablemente, ninguno de los ensayos demostró un beneficio asociado con la realización de estas pruebas (Henschke *et al.*, 2007). Más recientemente, los investigadores del *Early Lung Cancer Action Program* informaron de tasas de detección de 1,3% con tomografía computarizada (TC) a dosis bajas, lo cual es comparable con la

tasa obtenida en detección de cáncer de mama (Henschke *et al.*, 2006). Además, la tasa de supervivencia a los 10 años para pacientes con estadio inicial de cáncer de pulmón detectado por esta modalidad de cribado se estimó en 88%. A pesar de estos resultados, la posición de la *American Cancer Society* y del *United States Preventative Services Task Force* es que no hay pruebas suficientes para recomendar el cribado de los pacientes asintomáticos para cáncer de pulmón, ya sea con la citología de esputo, radiografía de tórax, TC a dosis bajas, o una combinación de las pruebas (Humphrey *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2009).

Recientemente, han sido publicados los resultados del mayor ensayo clínico aleatorizado (*The National Lung Screening Trial* -NLST) en el que se incluyeron 53.454 personas con alto riesgo de cáncer de pulmón, para determinar el impacto real del cribado con TC a dosis bajas en la mortalidad por cáncer de pulmón en la población. Los participantes incluidos fueron asignados aleatoriamente a someterse a tres revisiones anuales mediante TC a dosis bajas o bien a una sola mediante radiografía de tórax. Los resultados del NLST muestran una disminución de 20% en la mortalidad por cáncer de pulmón con TC a dosis bajas en comparación con la radiografía de tórax (Aberle *et al.*, 2011). Sin embargo, la TC a dosis bajas también se ha asociado con una alta tasa de resultados falsos positivos. Deben considerarse por tanto, como efectos negativos de la prueba TC el sobrediagnóstico y la asociación de la TC a dosis bajas con el desarrollo de cánceres inducidos por la radiación (efectos que no pueden medirse directamente y deben ser evaluados en futuros análisis). Es por esto que el uso potencial de la TC como una herramienta para la detección del cáncer de pulmón sigue siendo un tema de debate.

Debido a los conflictivos resultados de los programas de cribado basados en pruebas de imagen, actualmente hay un interés creciente en el desarrollo de modelos de predicción de riesgo que incorporen biomarcadores genéticos y moleculares y que se centran en el uso de muestras no invasivas o mínimamente invasivas tales como sangre, aire exhalado o esputo (Ghosal *et al.*, 2009; Jantus-Lewintre *et al.*, 2012; van't Westeinde and van Klaveren, 2011).

## 2.5. Diagnóstico y estadificación

El diagnóstico del cáncer de pulmón se ve dificultado por la ausencia de síntomas en pacientes con tumores en un estado precoz, diagnosticándose la mayoría de casos en fases ya avanzadas, cuando ya no es posible la intervención curativa (cirugía). Los síntomas más frecuentes que caracterizan la sospecha de cáncer de pulmón son tos, dolor torácico, hemoptisis o disnea. Las técnicas diagnósticas pretenden, en primer lugar, determinar la localización del tumor primario y su posterior estudio mediante anamnesis y exploración física del paciente, técnicas de imagen, como placa de tórax, TC, resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones (PET), y test de funcionalidad pulmonar. La confirmación histológica de la enfermedad requiere de tejido para estudio y es esencial en el diagnóstico. El tejido se puede obtener a partir de una biopsia, en pacientes que no pueden tolerar una operación o cuando se sospecha de enfermedad avanzada. En el caso de pacientes con sospecha de cáncer de pulmón reseccable, el diagnóstico puede realizarse en el momento de la cirugía.

Para proceder al diagnóstico es necesaria la determinación del estadio del cáncer en función de su extensión anatómica (estadificación). La estadificación del cáncer de pulmón se basa en la Clasificación de Tumores Malignos y utiliza tres parámetros: el tamaño tumoral, la infiltración de los nódulos linfáticos y la presencia o no de metástasis (Tumor/Nódulos/Metástasis –TNM) (Greene *et al.*, 2002). Estos parámetros tienen diversos subíndices que indican la magnitud de la afectación (Tablas 1 y 2). Esta clasificación es empleada principalmente para los tumores de célula no pequeña; mientras que en los tumores de célula pequeña, la aproximación más común es clasificarlos como enfermedad limitada o extendida.

**Tabla 1.** Clasificación TNM (6ª edición). Adaptada de Greene *et al.* (Greene *et al.*, 2002).

<b>Tumor primario (T)</b>	
<b>Tx</b>	El tumor primario no puede ser evaluado o tumor demostrado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no visualizado por técnicas de imagen o broncoscopia.
<b>T0</b>	No evidencia de tumor primario.
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> .
<b>T1</b>	Tumor de 3cm o menos en su dimensión mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar (esto es, no en el bronquio principal).
<b>T2</b>	Tumor con cualquiera de las características siguientes de tamaño o extensión: Más de 3cm en su dimensión mayor Afectación del bronquio principal, 2cm o más distal a la carina Invasión de la pleura visceral Asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar pero no afecta al pulmón entero.
<b>T3</b>	Tumor de cualquier tamaño que invade directamente cualquiera de los siguientes: pared torácica (incluyendo tumores del surco posterior), diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal menos de 2cm distal a la carina, pero sin afectación de la carina; o atelectasia asociada o neumonitis obstructiva del pulmón entero.
<b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral, carina; o nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo; o tumor con derrame pleural maligno.
<b>Nódulos linfáticos regionales (N)</b>	
<b>Nx</b>	Los nódulos linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
<b>N0</b>	No hay metástasis en nódulos linfáticos regionales.
<b>N1</b>	Metástasis en nódulos linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales y nódulos intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa del tumor primario.
<b>N2</b>	Metástasis en nódulos linfáticos mediastínicos ipsilaterales o subcarínicos.
<b>N3</b>	Metástasis en nódulos linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos ipsilaterales o contralaterales o supraclaviculares.
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
<b>Mx</b>	Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.
<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia.
<b>M1</b>	Presencia de metástasis a distancia.

**Tabla 2.** Agrupación por estadios (6ª edición). Adaptada de Greene *et al.* (Greene *et al.*, 2002).

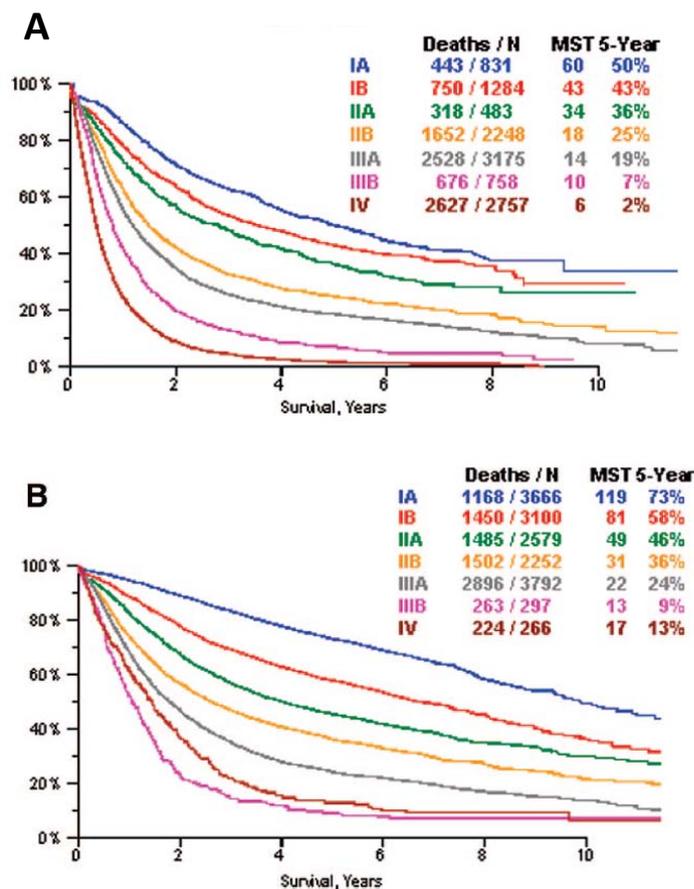
Estadios	T	N	M
<b>Oculto</b>	Tx	N0	M0
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T1	N1	M0
<b>IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>IIIB</b>	Cualquier T	N3	M0
	T4	Cualquier N	M0
<b>IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

En el año 2010 entró en vigor un nuevo sistema de estadificación, correspondiente a la 7ª edición, que lleva consigo el reordenamiento de los diferentes estadios en función de algunos cambios aplicados a la clasificación TNM. (Detterbeck *et al.*, 2009)

La importancia del TNM radica también en que provee una importante información pronóstica y terapéutica. Aquellos tumores con una localización e histología determinada y con la misma clasificación TNM presentan en principio el mismo comportamiento. De tal forma que a mayor estadio tumoral peor pronóstico (Goldstraw *et al.*, 2007) (Figura 2).

Esta estadificación tumoral puede realizarse en diferentes momentos del proceso diagnóstico-terapéutico, como puede ser: antes de tratamiento (estadificación clínica, TNMc), después del tratamiento quirúrgico (estadificación patológica o post-quirúrgica, TNMp), después o durante el tratamiento de inducción (estadificación

TNMy), al haber una recidiva tumoral después de un intervalo libre de enfermedad (estadificación TNMr) o en la autopsia (estadificación TNMa). La estadificación clínica permite adjudicar el mejor tratamiento al paciente, mientras que la estadificación patológica es más precisa que la estadificación clínica y se ajusta más a la realidad de la extensión tumoral, ya que sirve para emitir un pronóstico y para decidir la idoneidad del tratamiento de consolidación. La estadificación después o durante el tratamiento de inducción permite conocer si ha habido algún cambio tumoral en la clasificación clínica y decidir si el paciente puede o no ser sometido a tratamiento quirúrgico tras la terapia de inducción. Sin embargo, la tendencia actual es diseñar terapias más personalizadas basadas en las características moleculares de los tumores, como mutaciones y amplificaciones génicas, niveles de expresión de genes de reparación de ADN y perfiles genómicos o proteómicos (Rossi *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Curvas de supervivencia a los cinco años en pacientes con CPNM por estadio clínico (A) y por estadio patológico (B) (Goldstraw *et al.*, 2007).

## 2.6. Tratamiento

La elección del tratamiento en el cáncer de pulmón depende de la extensión de la enfermedad, la localización del tumor primario, la clasificación anatomopatológica y la presencia o no de comorbilidades en el paciente.

En pacientes diagnosticados de CPNM en estadios tempranos de la enfermedad (estadios I y II), la principal opción terapéutica es la cirugía con el fin de llevar a cabo la resección completa del tumor. Sin embargo, sólo un 20-30% de los pacientes diagnosticados son susceptibles de cirugía radical, presentando una tasa de curación entre el 40-50% y un alto riesgo de recaída (Spiro *et al.*, 2010). Por otro lado, el manejo de pacientes en estadio IIIA es más controvertido, pudiendo ser la resección quirúrgica, quimioterapia, radioterapia o una combinación estas modalidades la mejor opción, dependiendo de la situación clínica. La terapia postoperatoria, principalmente la quimioterapia adyuvante basada en combinaciones con sales de platino, mejora ligeramente la supervivencia y está indicada en pacientes resecados en estadios IIA-III A. Sin embargo, debido a las altas toxicidades asociadas al platino, otros regímenes quimioterápicos, en particular los basados en taxanos pueden considerarse como alternativas de tratamiento (Molina *et al.*, 2008).

La radioterapia es una opción paliativa en el caso de pacientes que no pueden ser candidatos a cirugía debido a una limitada reserva pulmonar o a la presencia de comorbilidades. En estos casos, la radioterapia sola como tratamiento local se ha asociado con tasas de supervivencia a los cinco años del 13 al 39% en pacientes en estadios tempranos (es decir, T1 y T2) (Dosoretz *et al.*, 1992).

Cerca del 70% de los pacientes con cáncer de pulmón presentan enfermedad localmente avanzada (IIIA y IIIB) o diseminada (IV) en el momento del diagnóstico, por lo que son considerados como “irresecables” y tratados habitualmente mediante radioterapia y/o quimioterapia. La quimioterapia paliativa resulta beneficiosa para estos pacientes, siendo el estándar generalmente aceptado, el régimen con platino o la combinación de este con agentes como paclitaxel, docetaxel, gemcitabina o vinorelbina (Molina *et al.*, 2008).

Otras estrategias empleadas en los últimos años, son las terapias dirigidas contra dianas moleculares específicas, que han permitido prolongar la supervivencia de los pacientes con CPNM, con menor toxicidad que la quimioterapia convencional. Las alteraciones moleculares, bien por sobreexpresión de ciertos genes, eventos mutacionales, o modificaciones epigenéticas en sus secuencias, son eventos frecuentes en el cáncer de pulmón. Estos cambios pueden incluir alteraciones en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), o en las vías de señalización implicadas en angiogénesis, apoptosis, regulación del proteosoma y control del ciclo celular, entre otros.

En el caso del EGFR, la presencia de ciertas mutaciones/deleciones en la región tirosina quinasa (TK) de este receptor, confiere sensibilidad a fármacos inhibidores de esta actividad quinasa (TKI), tales como: gefitinib y erlotinib (Rosell *et al.*, 2012; Rosell *et al.*, 2009). Estas mutaciones son más frecuentes en mujeres, con tumores de histología adenocarcinoma, no fumadoras y asiáticas, en las cuales la tasa de respuesta también es mayor.

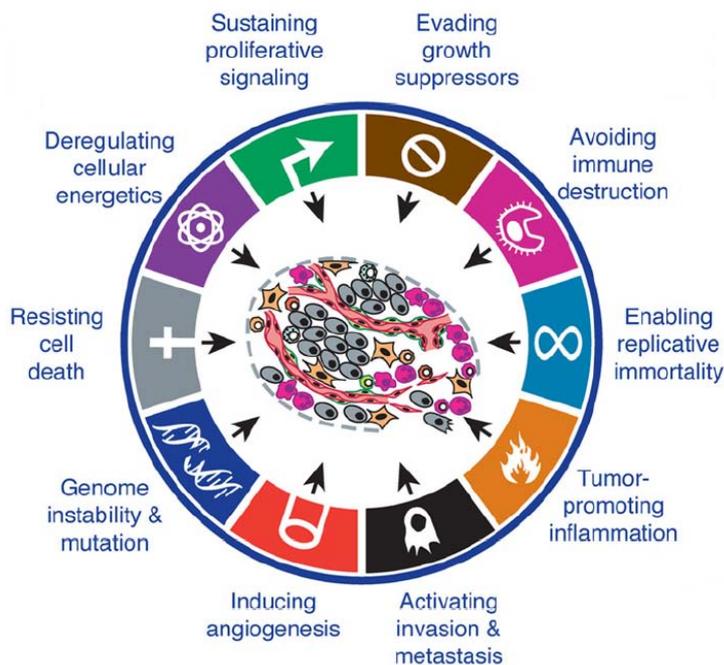
La inhibición de la angiogénesis es otra estrategia terapéutica novedosa. En este caso, la adición del anticuerpo monoclonal bevacizumab (dirigido contra el factor de crecimiento del endotelio vascular) a la quimioterapia consigue mejorar las tasas de respuesta y supervivencia (Sandler *et al.*, 2006).

En cuanto a los pacientes que presentan tumores de células pequeñas (CMP), los resultados inadecuados de la cirugía o la radioterapia solas, incluso en pacientes seleccionados, destacó la necesidad del tratamiento sistémico, mientras que el papel principal de la quimioterapia en el tratamiento de esta enfermedad está bien establecido. Estos pacientes suelen tratarse mediante una combinación de quimioterapia y radioterapia en aquellos casos en que la enfermedad está limitada (30% de los diagnosticados), con una tasa de supervivencia a los cinco años de aproximadamente un 25%. Sin embargo, la mayoría de pacientes con CMP suelen recaer en el primer año de la terapia. Por otro lado, cuando la enfermedad está extendida raramente es curable y se trata con quimioterapia paliativa (Sekido *et al.*, 2005).

### 3. Biología molecular del cáncer de pulmón

#### 3.1. Características moleculares del cáncer

Hanahan y Weinberg postularon en el año 2000 un modelo unificador que proponía seis características o alteraciones en la fisiología celular compartidas por todos los tipos celulares tumorales, esenciales para el desarrollo del cáncer (*Hallmarks of cancer*). Estas alteraciones se definen como capacidades funcionales adquiridas por las células tumorales, vía distintos mecanismos y en varios momentos durante el curso de la tumorigénesis, que les confieren ventajas en supervivencia, proliferación y diseminación (Hanahan and Weinberg, 2000). Recientemente se ha postulado la necesidad de incorporar a estas seis características, otros 4 atributos distintos que presentan las células cancerosas fundamentales también para el desarrollo del cáncer (Figura 3). Además, en su última revisión, estos autores postulan que la biología de los tumores no puede entenderse simplemente por la enumeración de los rasgos del cáncer, sino que debe abarcar también la contribución del microambiente tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011).



**Figura 3.** Principales características del cancer - "*Hallmarks of cancer*"- (Hanahan and Weinberg, 2011)

1. Independencia de las señales de crecimiento. Las células normales requieren señales mitogénicas para pasar de un estado quiescente a un estado proliferativo. Estas señales son transmitidas al interior celular (transducción) mediante receptores transmembrana a los que se unen diferentes tipos de moléculas de señalización o comunicación intercelular como factores de crecimiento solubles y componentes de la matriz celular, entre otros. En ausencia de estas señales estimuladoras, las células normales no pueden crecer. Por el contrario, las células tumorales pueden crecer sin necesidad de que se produzcan dichas interacciones, ya que o bien generan muchas de sus propias señales de crecimiento o bien activan intrínsecamente a los receptores transmembrana en ausencia de ligando, reduciendo así su dependencia de la estimulación desde el microambiente del tejido normal.
2. Insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento. Múltiples señales antiproliferativas funcionan en las células normales para mantener la quiescencia celular y la homeostasis tisular. Por ejemplo, las señales inhibitoras del crecimiento son finalmente canalizadas a través de la proteína retinoblastoma (RB1). A nivel molecular el gen *RB1* juega un papel muy importante, por eso en muchos tumores aparece mutado. En las células neoplásicas la disrupción de la vía de RB1 permite la liberación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes esenciales para la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Esto permite la proliferación celular y hace a las células insensibles frente a los factores que evitan el crecimiento y que normalmente actúan a lo largo de esta vía.
3. Evasión de la apoptosis. La capacidad de las poblaciones de células tumorales para expandirse en número está determinada por una ratio entre mitosis y muerte celular por necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La resistencia a la apoptosis por parte de las células tumorales puede darse según diferentes estrategias, siendo la más común la pérdida de función del regulador proapoptótico TP53, debido a mutaciones en dicho gen. De esta manera se consigue eliminar un componente clave que induce la apoptosis cuando se detecta daño en el ADN.

4. Potencial replicativo ilimitado. Las células de mamíferos poseen un programa intrínseco que limita el número de divisiones celulares que puedan ocurrir (60-70 duplicaciones), el límite de Hayflick, pasado el cual, dichas células detienen su crecimiento e inician un proceso denominado senescencia (Hayflick, 1997). La senescencia en las células normales es producida debido a la pérdida de la función protectora de los telómeros. En cambio, en las células neoplásicas se ha evidenciado el mantenimiento de la longitud de los telómeros en la mayoría de tipos de cáncer (Shay and Bacchetti, 1997) debido a una mayor actividad de la enzima telomerasa.
5. Angiogénesis sostenida. La angiogénesis forma parte también de las principales características de las células tumorales, descritas ya en el año 2000 por Hanahan y Weinberg. El aporte de oxígeno y nutrientes es esencial para la función y supervivencia celular. Por ello, la generación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para que el tumor pueda crecer más allá de 1-2mm<sup>3</sup> (Folkman, 2003). La angiogénesis está regulada por el equilibrio entre factores inductores y factores inhibidores. Los tumores tienen la capacidad de activar la angiogénesis inclinando la balanza a favor de los inductores de este proceso.
6. Invasión tisular y metástasis. La capacidad de invasión permite a las células neoplásicas escapar de la masa tumoral primaria y colonizar otras partes del cuerpo (metástasis). Al igual que en el tumor primario, el éxito en estos procesos depende de la adquisición de las cinco características anteriores. Los procesos de invasión y metástasis son extremadamente complejos, implicando cambios en las relaciones físicas entre las células y su microambiente y la activación de las proteasas extracelulares.
7. Inestabilidad genómica y mutación. La adquisición de las múltiples alteraciones mencionadas anteriormente depende en gran medida de una sucesión de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas. Los sucesivos pasos de la progresión tumoral pueden ser entendidos como una secuencia de expansiones clonales, cada una de las cuales es provocada por la adquisición de un genotipo mutante favorable que resulta en una ventaja selectiva.

8. Inflamación. Está demostrado que la generación de sustancias químicas muy reactivas que acompañan a la inflamación tiene un marcado papel genotóxico en las células. Además se ha constatado que tejidos crónicamente inflamados son más susceptibles a desarrollar tumores. La inflamación es evidente en muchos casos en estadios tempranos del cáncer y por ello, se ha incluido como otro de los puntos esenciales del proceso neoplásico. Sustentan esta inclusión, estudios que demuestran que ciertos mecanismos relacionados con la inflamación producen inestabilidad genética permitiendo la acumulación de alteraciones moleculares.
9. Reprogramación del metabolismo energético. La enfermedad neoplásica no solo implica la desregulación del control de la proliferación celular, sino también los ajustes correspondientes en el metabolismo energético con el fin de estimular el crecimiento y la división celular. Otto Warburg fue el primero en observar una característica anómala en el metabolismo energético de las células cancerosas que denominó “glicólisis aerobia” (Warburg, 1956). Este tipo de metabolismo parece estar presente también en tejidos embrionarios, lo que apoya su importancia en los programas de gran escala biosintética que se requieren para la proliferación celular activa.
10. Evasión del sistema inmunológico. La aparición de tumores parece reflejar, de alguna manera, que las células cancerosas han logrado evitar la detección por parte del sistema inmune o han sido capaces de limitar el alcance de la destrucción inmunológica y por tanto de evadir su erradicación. De manera simplificada se podría decir que las células cancerosas altamente inmunogénicas pueden evadir la destrucción inmunológica mediante la desactivación de componentes del sistema inmune que han sido enviados para eliminarlas.

### **3.2. Alteraciones moleculares en cáncer de pulmón**

Actualmente se acepta que la transformación del epitelio bronquial normal a cáncer de pulmón requiere de una serie de alteraciones moleculares tanto genéticas como epigenéticas. Estos cambios moleculares dan lugar finalmente a la derogación de las

principales vías de control de la regulación y el crecimiento celular. Los principales tipos de genes involucrados en la carcinogénesis pulmonar son los oncogenes y los genes supresores de tumores, mientras que las evidencias no son aún concluyentes para el caso de la disfunción de los genes de reparación del ADN (Sekido *et al.*, 2005).

Desde una perspectiva funcional, un oncogén es un gen que tiene potencial para transformar una célula normal en maligna que desarrollará un determinado tipo de cáncer; en cambio, un gen supresor tumoral es un gen con capacidad para inhibir el crecimiento de una célula tumoral. Las alteraciones genéticas pueden conducir a una ganancia de función, en el caso de los oncogenes, o a una inactivación de la proteína codificada, en los genes supresores de tumores. Los oncogenes habitualmente están activados a través de mutaciones puntuales, amplificaciones génicas o traslocaciones cromosómicas; mientras que los genes supresores de tumores son inactivados mediante alteraciones bialélicas, que son combinaciones de mutaciones puntuales, deleciones e hipermetilación del promotor (Sanchez-Cespedes, 2003).

Muchos de los cambios en oncogenes y genes supresores de tumores son comunes a ambos subtipos de cáncer de pulmón (CPNM y CMP), aunque algunos subtipos pueden ser más propensos a ciertas mutaciones. Tras la generación de un cáncer manifiesto, estos y otros cambios pueden influir en los procesos de invasión, metástasis y resistencia al tratamiento. Para la traslación de estas alteraciones moleculares a la clínica es importante identificar la naturaleza y frecuencia de las alteraciones, evaluar si presentan una asociación importante con la clínica y determinar si tienen un uso clínico en el diagnóstico temprano, monitorización de tratamientos o como dianas para el desarrollo de nuevas terapias (Sekido *et al.*, 2005).

### **- Oncogenes**

En cáncer de pulmón, se han descrito pocas alteraciones que afectan a oncogenes. Los más comunes son los de la familia *RAS*, *MYC* y *EGFR*.

La familia *RAS* codifica proteínas implicadas en procesos de transducción de señal, sobre todo vinculadas a procesos de proliferación celular y su mutación provoca que estas proteínas estén constantemente en su forma activada. La familia de genes *RAS* (*KRAS*, *HRAS* y *NRAS*) pueden estar activados por mutaciones puntuales en los codones 12, 13 o 61. Un miembro de esta familia se encuentra mutado en aproximadamente el 20-30% de CPNM (en particular en adenocarcinomas), pero casi nunca en CMP. *KRAS* representa el 90% de las mutaciones de *RAS* en los adenocarcinomas de pulmón, con aproximadamente el 85% de las mutaciones del gen *KRAS* afectando al codón 12 (Rodenhuis *et al.*, 1987; Sekido *et al.*, 2005). Sin embargo, ni la quimiosensibilidad ni la supervivencia se relacionan con la mutación del gen *KRAS* en adenocarcinomas de pulmón en estadio avanzado (Camps *et al.*, 2011; Rodenhuis *et al.*, 1997).

La familia de oncogenes *MYC* (*MYC*, *MYCN* y *MYCL1*) se activan principalmente por amplificación genética, normalmente en CMP pero no exclusivamente, con 20-100 copias del gen por célula. Aunque el oncogen *MYC* más comúnmente amplificado es *MYCL1*, cualquier miembro de la familia puede estar amplificado genéticamente, siendo los eventos de amplificación mutuamente excluyentes. Cuando la proteína *MYC* heterodimeriza con una proteína llamada *MAX*, funciona como factor de transcripción necesario para la progresión normal del ciclo celular, la diferenciación y la muerte celular programada. La amplificación de *MYC* se produce en un 20-30% de los CMP (frecuentemente en pacientes tratados previamente con quimioterapia) y su presencia se correlaciona con una peor supervivencia (Sanchez-Cespedes, 2003).

La sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) se ha observado en aproximadamente el 70% de CPNM, siendo un factor pronóstico de peor supervivencia. La coexpresión de *EGFR* y sus ligandos, especialmente del factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (*TGFA*), por las células de cáncer de pulmón indica la presencia de un bucle autocrino de autoestimulación del factor de crecimiento (Sekido *et al.*, 2005). En 2004 se identificaron varias mutaciones activadoras que afectan al gen de *EGFR* en pacientes con CPNM. Estas mutaciones (tanto deleciones, inserciones como mutaciones puntuales) se producen en el dominio quinasa provocando que el receptor tenga una estimulación prolongada después de la estimulación por el factor

de crecimiento epidérmico (EGF) y confieren a los tumores gran sensibilidad a fármacos inhibidores de esta actividad quinasa (TKI), como son gefitinib o erlotinib. Estas mutaciones son más frecuentes en mujeres, con tumores de histología adenocarcinoma, no fumadoras y asiáticas, en las cuales la tasa de respuesta también es mayor. Pero aunque está claro que estos agentes pueden inducir la regresión tumoral en gran variedad de cánceres humanos, obteniéndose respuestas clínicamente significativas, sin embargo, estas respuestas son transitorias y por ello es necesario el perfeccionamiento de estas terapias (Lynch *et al.*, 2004;Paez *et al.*, 2004;Rosell *et al.*, 2009;Taron *et al.*, 2005).

Las mutaciones en *EGFR* y *KRAS* son mutuamente excluyentes, predominando en adenocarcinomas con etiología diferente, aparecen en no fumadores y fumadores respectivamente. Este hallazgo puede ser relevante por el hecho de que ambas proteínas están involucradas en la misma vía molecular, ya que la vía de señalización de *KRAS*-*MAPK* se encuentra por debajo en la cascada de señalización de *EGFR* (Suda *et al.*, 2010).

Otros receptores de membrana activados en cáncer de pulmón, aunque con menor frecuencia y preferentemente en adenocarcinomas, son *CMET* y *ALK*. El receptor *ALK* está activado debido a su fusión con *EML4* mediante translocaciones cromosómicas. El receptor TK codificado por la fusión de los genes *EML4-ALK*, no presente en tejido normal (Soda *et al.*, 2007), es una diana prometedora en la terapia contra el cáncer de pulmón ya que los tumores que expresan esta proteína de fusión son resistentes al tratamiento con inhibidores de *EGFR* (Horn and Pao, 2009). También la amplificación de *CMET* está relacionada con la adquisición de resistencia secundaria a inhibidores de *EGFR* (Engelman *et al.*, 2007).

Estos y otros hallazgos recientes de varios estudios proporcionan nuevos conocimientos sobre las bases moleculares de la resistencia a TKI del *EGFR*, incluyendo además de la co-activación de *MET*, y la expresión de *EML4-ALK*, la pérdida de *PTEN* (supresor de tumores), la mutación del gen *KRAS*, y la adquisición de la mutación de resistencia del *EGFR* (T790M). Por ello, las estrategias actuales se centran en lograr una inhibición más completa para superar todas estas resistencias (Vivanco and Mellinghoff, 2010).

También el gen *PIK3CA* se encuentra activado en cáncer de pulmón preferentemente mediante amplificación génica y en menor medida por mutaciones puntuales, especialmente en carcinomas escamosos (Angulo *et al.*, 2008; Samuels *et al.*, 2004). Este gen codifica la proteína p110 que es la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). La PI3K fosforila el fosfoinosítido-3,4-difosfato (PIP2) a fosfoinosítido-3,4,5-trifosfato (PIP3), ambas son moléculas mensajeras que regulan la localización y función de múltiples efectores.

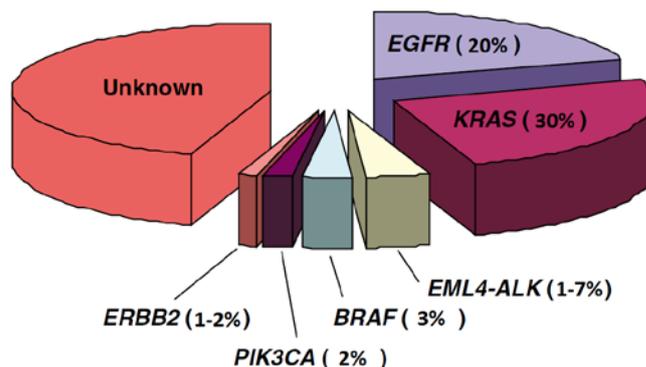
### - Genes supresores de tumores

El gen supresor de tumores más comúnmente mutado en cáncer es *TP53*. Los tipos de mutación de *TP53* difieren entre tumores como consecuencia de la exposición a carcinógenos específicos. En cáncer de pulmón, hay un aumento de la frecuencia de transversiones de G a T debido a la exposición a los carcinógenos del tabaco. Las mutaciones en *TP53* son muy frecuentes en CMP, afectando al 90%, mientras que en CPNM afectan aproximadamente al 50%, variando según el tipo histológico. La proteína TP53 es un factor de transcripción que actúa en respuesta al daño del ADN causado por la radiación gamma, la luz ultravioleta, los carcinógenos y la quimioterapia (Sekido *et al.*, 2005).

Otras inactivaciones génicas comunes se pueden encontrar en los reguladores del ciclo celular *P16INK4A* (en el 40-60% de los tumores, principalmente en CPNM) y *RB1* (retinoblastoma) (principalmente en CMP) y en los genes *LKB1/STK11* y *PTEN/MMAC1*. La vía p16INK4A-ciclina D1-(CDK4)-retinoblastoma (RB1) es clave en la regulación del ciclo celular y en la transición G1/S. El resultado de la inhibición de esta vía es la supresión del crecimiento. Las alteraciones de p16INK4A y RB1 son además mutuamente excluyentes. Por otro lado, el gen *PTEN* codifica una fosfatasa que desfosforila el PIP3. Las alteraciones genéticas en *PTEN* son frecuentes en cáncer de pulmón y se dan especialmente en CMP y en carcinomas epidermoides (Sanchez-Cespedes, 2003).

### 3.3. Clasificación molecular del cáncer de pulmón

El estudio de las alteraciones moleculares en cáncer de pulmón contribuye a conocer mejor el proceso de carcinogénesis, ya que la heterogeneidad histológica y biológica son fenómenos bien conocidos en CPNM. La generalización de técnicas de biología molecular aplicadas al conocimiento de las neoplasias permite por una parte la identificación de múltiples mutaciones relevantes clínicamente que mejoran la comprensión de la patogénesis en cáncer de pulmón y aporta la confirmación de la heterogeneidad en este grupo de neoplasias, pero por otra parte puede conducir a la renovación completa de la clasificación, abriendo el camino hacia una clasificación molecular de los carcinomas pulmonares. Además, los avances en el conocimiento de las bases moleculares del CPNM anuncian una revolución en el tratamiento personalizado del cáncer (Hirsch *et al.*, 2010;Ladanyi, 2008;Pao and Girard, 2011). Concretamente, la heterogeneidad clínica, radiológica e histopatológica del adenocarcinoma de pulmón hace ya imprescindible obtener pruebas moleculares para clasificar y seleccionar a los pacientes candidatos a determinadas terapias según su perfil molecular. En la actualidad, el análisis mutacional del gen de *EGFR* debe ser la norma principal para la selección de pacientes que puedan ser candidatos a recibir tratamiento con inhibidores de EGFR (TKIs), ya que representa la prueba disponible más exacta para la predicción de respuesta. Pero además, se han descrito nuevas mutaciones que tienen cierto impacto sobre la selección de tratamiento, por lo que la rutina del diagnóstico molecular en cáncer de pulmón se ampliará más allá del perfil mutacional de EGFR (Figura 4) (Dacic, 2011;Ladanyi and Pao, 2008;Pao and Girard, 2011). Por todo ello, en cáncer de pulmón es ya una necesidad la integración del diagnóstico molecular en el flujo de trabajo de los laboratorios de patología; la disponibilidad de muestra biológica en cantidad y calidad suficiente; así como el desarrollo de técnicas estandarizadas, de alto rendimiento y alta sensibilidad, que permitan llevar a cabo las técnicas histológicas y moleculares requeridas (Dacic, 2011;Ladanyi, 2008).



**Figura 4.** Gráfico circular que representa la clasificación molecular del adenocarcinoma de pulmón en función de mutaciones activadoras en moléculas señalizadoras. Todas las mutaciones son mutuamente excluyentes con la excepción de PIK3CA. Adaptado de Ladanyi and Pao (Ladanyi and Pao, 2008).

## 4. Neovascularización tumoral

La neovascularización es el mecanismo de formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor. Este proceso se inicia en etapas tempranas de la enfermedad, resultando clave en el crecimiento y diseminación tumoral. Tanto es así, que sin la formación de nuevos vasos sanguíneos, la carencia de oxígeno y nutrientes limita la expansión de la masa neoplásica a un tamaño de 1-2 mm (Folkman, 2003). La neovascularización tiene un efecto dual sobre el tumor. Por un lado, suministrar nutrientes y oxígeno, además de factores de crecimiento que estimulan el crecimiento de las células tumorales (Veikkola *et al.*, 2000). Por otro lado, junto con la linfangiogenesis, es un elemento esencial para la formación de metástasis al proveer un sitio de entrada a la circulación, permitiendo que las células que se desprenden del tumor viajen a través del torrente circulatorio, pudiendo llegar a órganos a distancia donde metastatizar (Zetter, 1998).

La neovascularización puede darse mediante dos mecanismos: la vasculogénesis y la angiogénesis.

### 4.1. Vasculogénesis

La vasculogénesis se define como la formación *de novo* de vasos sanguíneos por diferenciación y ensamblaje de precursores de células endoteliales y otras células derivadas de médula ósea (Ahn and Brown, 2009). Este proceso ocurre en el desarrollo

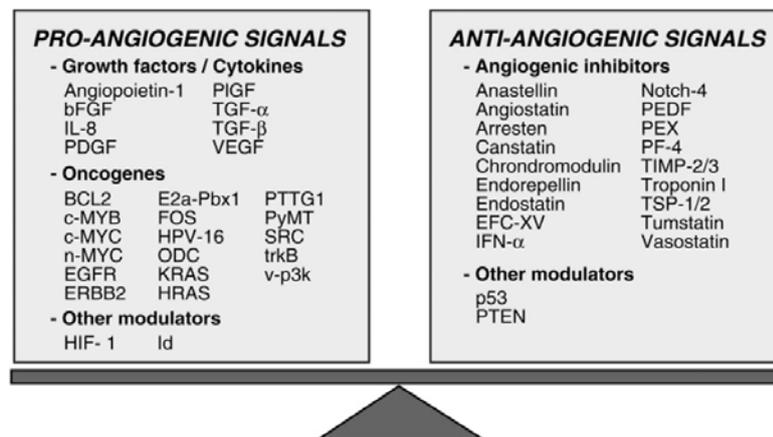
temprano del embrión, aunque hallazgos recientes muestran que bajo circunstancias específicas, las células precursoras (tanto de médula ósea como de la sangre) pueden contribuir también en la angiogénesis adulta (Rafii *et al.*, 2002).

## 4.2. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente en respuesta a estímulos y es el mecanismo más estudiado y conocido.

Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis: la fisiológica y la patológica. La primera, ocurre durante el crecimiento necesario de vasculatura que comienza en la embriogénesis y que continúa después del nacimiento en el desarrollo temprano postnatal, para proveer de manera adecuada el oxígeno y los nutrientes requeridos por los órganos en crecimiento, además de proporcionar señales morfológicas. A lo largo del crecimiento, así como en la etapa adulta, la velocidad de proliferación y renovación de las células endoteliales es muy baja. Las excepciones fisiológicas en las que se produce angiogénesis, bajo una estrecha regulación, ocurren únicamente en el ovario en mujeres menstruantes, debido a que el crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo dependen de la proliferación de nuevos vasos capilares; en la placenta durante el embarazo y también en la reparación o cicatrización de heridas. El mecanismo fisiológico implica una estructura y funcionamiento jerárquico bien ordenado de la vasculatura corporal, con arteriolas, capilares y vénulas fácilmente distinguibles (Martinez-Ezquerro and Herrera, 2006). Por el contrario, la angiogénesis patológica se caracteriza por un crecimiento descontrolado y desordenado de la vasculatura y aparece cuando hay un desbalance entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos. Los vasos tumorales se desarrollan a menudo en haces desorganizados que contienen numerosos brotes y el diámetro de la luz del vaso es irregular. Debido a la organización anormal y a la estructura de los vasos tumorales, el flujo sanguíneo en los tumores es caótico (Roskoski, Jr., 2007). La primera descripción de este proceso la realizó Judah Folkman en los años 70 (Folkman *et al.*, 1971a).

El desarrollo tumorigénico implica la expresión de un fenotipo angiogénico, en el que la suma de las actividades de las moléculas expresadas y secretadas permitan inducir el proceso de angiogénesis. Las células tumorales pueden sobreexpresar uno o más reguladores positivos de la angiogénesis, movilizar una proteína angiogénica de la matriz extracelular, reclutar células huéspedes como los macrófagos (que producen sus propias proteínas angiogénicas) o pueden combinarse estos procesos. La angiogénesis tumoral está mediada por factores de crecimiento secretados por el tumor que interactúan con sus receptores expresados en la superficie de las células endoteliales. La sobreexpresión de un factor angiogénico no es suficiente por sí misma para inducir la angiogénesis tumoral, ya que algunos reguladores negativos o inhibidores del crecimiento vascular deberán también estar infraexpresados. Por tanto, la inducción del fenotipo angiogénico está regulada por un cambio en el equilibrio local entre reguladores positivos y negativos del crecimiento de vasos (Gupta and Qin, 2003) (Figura 5) . La magnitud y calidad de la respuesta angiogénica tumoral está determinada específicamente por la suma de las señales pro- y antiangiogénicas en múltiples tipos celulares. Se denomina “interruptor angiogénico” a la transición de la fase latente a la fase invasiva de un tumor maligno, y representa un paso discreto en el desarrollo del tumor que puede ocurrir en diferentes etapas de la progresión tumoral, dependiendo de la naturaleza del tumor y su microambiente. La combinación de señales estimuladoras dentro del microambiente tumoral provoca cambios en múltiples tipos de células (Bergers and Benjamin, 2003; Weis and Cheresh, 2011).



**Figura 5.** Principales activadores e inhibidores angiogénicos (Hamano and Kalluri, 2005).

La activación de la angiogénesis se inicia con el incremento de la permeabilidad vascular de los vasos preexistentes, en respuesta a factores estimuladores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF) o la angiopoyetina 1 (ANG-1). Esto va acompañado del desprendimiento de las células perivasculares de los vasos sanguíneos maduros, lo cual se debe principalmente a la función de la angiopoyetina 2 (ANG-2) y su receptor TIE2 (receptor TK selectivamente expresado en las células endoteliales). Esto posibilita la extravasación de proteínas plasmáticas que establecen una matriz provisional en la que las células endoteliales activadas migran. La membrana basal y la matriz extracelular son localmente degradadas por metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), permitiendo que las células endoteliales subyacentes migren al espacio perivascular, atraídas por los estímulos angiogénicos que producen las células tumorales y el microambiente (Bergers and Benjamin, 2003). Varios tipos de células se exponen a los estímulos angiogénicos e inflamatorios que intensifican la respuesta. Las plaquetas son reclutadas a los sitios de membrana basal expuesta, donde se activan y liberan múltiples factores de crecimiento al microambiente, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el VEGF, el factor de crecimiento transformante (TGFA y TGFB1), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) y ANG-1. Estos factores estimulan la proliferación y migración endotelial, así como la formación del tubo. Las células endoteliales progenitoras y las células mieloides de médula ósea migran hacia los tejidos en el proceso angiogénico, gracias a señales quimiotácticas debidas a la liberación de factores solubles a nivel local. Además, las células madre tumorales pueden diferenciarse para convertirse en células endoteliales y las células tumorales pueden participar físicamente en la formación de nuevos vasos a través de mimetismo vascular (Weis and Cheresh, 2011). Como consecuencia de los estímulos angiogénicos, las células endoteliales proliferan formando una columna migratoria en el espacio perivascular, guiadas presumiblemente por los pericitos, y se adhieren entre sí para crear un lumen. Finalmente, los nuevos vasos sanguíneos en formación deben estabilizarse o madurar. El proceso de estabilización vascular se rige por ANG-1 y su receptor TIE2. La unión de ANG-1 a TIE2 en las células endoteliales activadas conduce a la producción de PDGF y al reclutamiento de células musculares lisas y

pericitos que recubren la nueva membrana basal. Sin embargo, en la vasculatura tumoral el recubrimiento de pericitos disminuye o es inadecuado, existen fenestraciones y huecos transcelulares, la membrana basal es incompleta y además, las paredes de los vasos sanguíneos tumorales pueden estar formadas tanto por células endoteliales como tumorales, lo que explica que se presenten diámetros irregulares y anomalías estructurales (Bergers and Benjamin, 2003; Papetti and Herman, 2002).

La angiogénesis no participa en la carcinogénesis en sí, pero sí promueve la progresión tumoral (Carmeliet, 2005) y es un elemento esencial para la formación de metástasis al proveer un sitio de entrada a la circulación. Debido a la importancia de este proceso en el crecimiento y progresión tumoral, la angiogénesis ha sido foco de intensos estudios en los últimos años, incluyendo también el desarrollo de agentes farmacológicos que inhiben la angiogénesis como una atractiva diana antitumoral.

### **4.3 Linfangiogénesis**

La linfangiogénesis representa el proceso de formación de nuevos vasos linfáticos a partir de los ya existentes y resulta relevante en la formación de metástasis.

La vasculatura linfática consiste en una capa fina de endotelio poco recubierto de pericitos o células musculares lisas vasculares, y su función fisiológica consiste en recoger líquido extravasado, macromoléculas y leucocitos y transportarlos hacia los ganglios linfáticos regionales para proceder a la vigilancia inmunitaria y, en último término, efectuar su transporte hacia la circulación. En adultos, el crecimiento de los vasos linfáticos parece deberse principalmente al proceso de brotado de nuevos vasos linfáticos a partir de los ya preexistentes. La linfangiogénesis es un proceso complejo, controlado por muchos factores producidos por distintos tipos de células y cuyo resultado funcional puede depender del efecto combinado de todos ellos (Cao, 2009).

Igual que sucede en la vasculatura sanguínea, los vasos linfáticos de la mayoría de los tejidos y órganos del adulto se mantienen quiescentes en condiciones fisiológicas,

y es en respuesta a la señales del crecimiento cuando tienen que proliferar, migrar y formar una vasculatura madura y funcional. A diferencia del endotelio del vaso sanguíneo, los vasos linfáticos contienen una membrana basal incompleta que podría degradarse para exponer las células endoteliales a los mitógenos, aunque no se conoce demasiado sobre el proceso de degradación de la membrana basal y de los sucesos de ramificación de los vasos linfáticos en crecimiento (Cao, 2009).

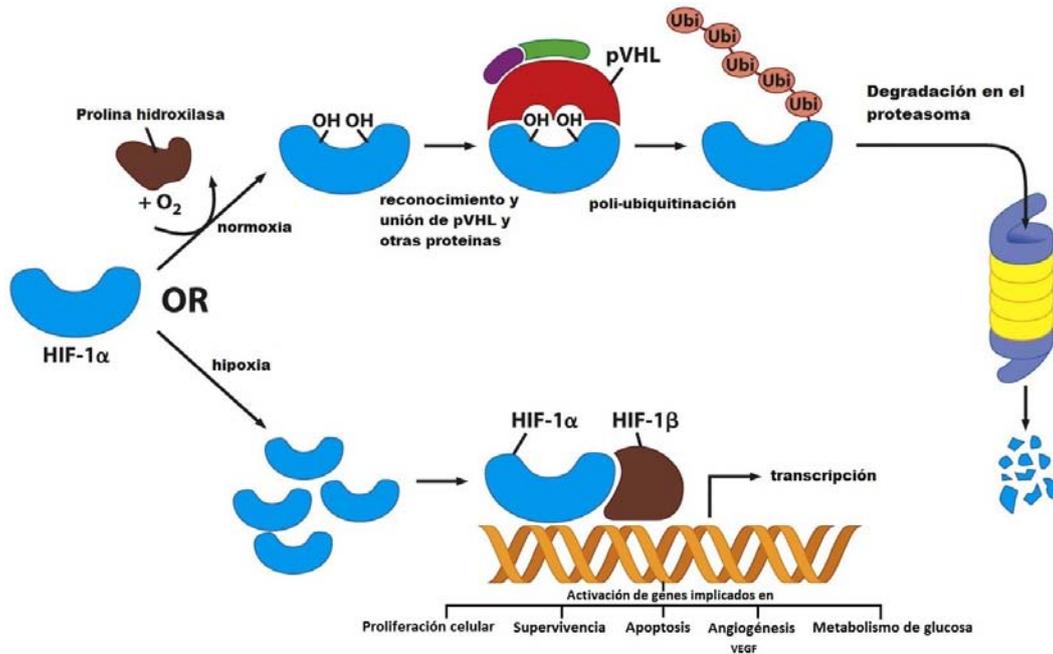
La diseminación de las células tumorales desde el tumor primario hacia otros órganos puede tener lugar a través de los vasos sanguíneos y también a través de las redes linfáticas. De hecho, el mecanismo más común por el que se genera la metástasis consiste en la propagación de las células neoplásicas dentro de los vasos linfáticos (Werynska *et al.*, 2009). Se ha propuesto que la entrada de las células cancerosas en los vasos linfáticos podría estar facilitada por su mayor permeabilidad en comparación con los vasos sanguíneos y por la ausencia de una barrera de la membrana basal normal (Tobler and Detmar, 2006).

El estudio del desarrollo de las redes linfáticas es un campo de creciente interés en oncología y ha tomado gran envergadura dentro de la investigación en angiogénesis (Bikfalvi, 2007). Inicialmente, la mayoría de estudios se focalizaban en el tumor primario en crecimiento y tejidos adyacentes, proceso conocido como “linfangiogénesis tumoral”. Sin embargo, también se ha observado linfangiogénesis alrededor de los nódulos linfáticos, en particular de los ganglios centinelas, donde inicialmente metastatiza el tumor, y esto se conoce como “linfangiogénesis de nódulos linfáticos” (Nagahashi *et al.*, 2010). Evidencias recientes indican que las células tumorales pueden inducir linfangiogénesis de nódulos linfáticos, aún antes de metastatizar, y que las células tumorales metastásicas continúan induciendo el crecimiento de vasos linfáticos en los ganglios centinela, teóricamente promoviendo su futura diseminación metastásica (Wissmann and Detmar, 2006) (Dadras *et al.*, 2005), por lo que el estudio en profundidad de los mecanismos moleculares involucrados en este tipo de procesos, genera gran expectativa como posibles nuevas dianas de acción terapéutica.

## **5. Factores estimuladores e inhibidores de la angiogénesis y linfangiogénesis**

### **5.1. Respuesta fisiológica a la hipoxia y el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF)**

La hipoxia es uno de los principales factores implicados en la progresión tumoral, ya que regula la angiogénesis. Aunque se han reportado varios factores de transcripción involucrados en la respuesta al estrés hipóxico, como AP-1 y NF- $\kappa$ B, HIF-1 es el inductor más potente. HIF-1 es un activador transcripcional heterodimérico compuesto por una subunidad  $\alpha$  (HIF-1A) y una subunidad  $\beta$  (ARNT) (Shi and Fang, 2004). La síntesis de HIF-1A está regulada por la activación de las vías de PI3K y MAPK, las cuales pueden ser activadas por la señalización a través de receptores TK, receptores no TK o receptores acoplados a proteína G. En condiciones de normoxia, la enzima proil 4-hidroxilasa (PHD) se une al oxígeno molecular e hidroxila residuos de prolina en HIF-1A. HIF-1A hidroxilado es reconocido por la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL), es ubiquitinilado y rápidamente degradado vía proteosoma. Sin embargo, es en condiciones de hipoxia, cuando se inhibe la hidroxilación de HIF-1A, de manera que éste se estabiliza y se permite la formación del heterodímero  $\alpha/\beta$ , que actúa activando la transcripción de más de 40 genes (Figura 6). La hipoxia regula la angiogénesis a través de un aumento de HIF-1A, que inicia un programa de supervivencia y expresión génica adaptativa. Entre los genes activados por HIF-1, los cuales contienen en la región promotora un elemento de respuesta a hipoxia (HRE), hay muchos que codifican para proteínas involucradas en metabolismo de glucosa, proliferación celular, supervivencia, apoptosis, invasión, metástasis y angiogénesis, y entre ellos destaca VEGF. La activación de genes vía hipoxia, tiene como finalidad incrementar el aporte de oxígeno o la adaptación metabólica a la hipoxia. HIF-1A se encuentra sobreexpresado en cánceres humanos como resultado de la hipoxia intratumoral, así como por alteraciones genéticas (Bikfalvi, 2007; Semenza, 2003).



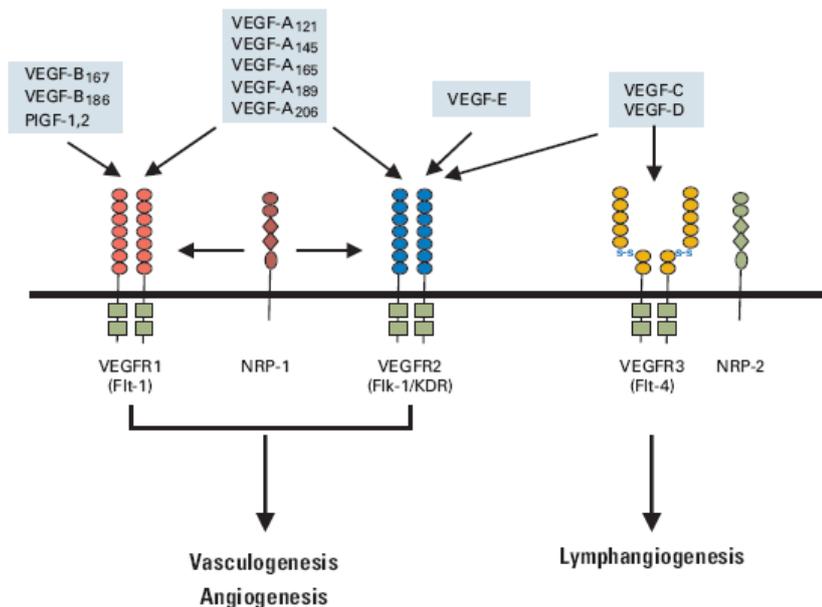
**Figura 6.** Regulación de la actividad de HIF-1 en condiciones de hipoxia y normoxia. Imagen adaptada de *The Biology of Cancer* (Weinberg, 2007).

## 5.2. Familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

Actualmente se reconoce al sistema que incluye al VEGF y sus receptores como el principal regulador de los procesos angiogénicos y linfangiogénicos (Hicklin and Ellis, 2005). Esta familia incluye cinco ligandos descritos en humanos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y Factor de crecimiento placentario (PlGF); y dos ligandos más, VEGF-E, descrito solamente en Orf virus y VEGF-F, aislado en el veneno de ciertas víboras. (Figura 7). Cada una de estas proteínas contiene una secuencia señal que se escinde durante la biosíntesis. Además, el procesamiento alternativo (*splicing*) de sus correspondientes pre-ARNs genera múltiples isoformas de VEGF-A, VEGF-B y PlGF (Roskoski, Jr., 2007). El proceso de señalización se encuentra mediado por uniones de alta afinidad de los ligandos con receptores específicos que tienen actividad TK intrínseca. Hasta hoy, se conocen tres receptores, relativamente específicos de las células endoteliales. Estos son: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, (originalmente denominados FLT-1, KDR y FLT-4, respectivamente) (Veikkola *et al.*, 2000). En adultos, los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se expresan principalmente en el endotelio vascular, mientras que el VEGFR-3 se limita en gran medida al endotelio linfático.

El VEGF activo está compuesto por dos subunidades idénticas y la unión a su receptor es mediada por el homodímero a través de la unión del núcleo de la proteína. Los receptores son dímeros anclados a la superficie de las células endoteliales. Cada una de las subunidades tiene siete dominios homólogos a inmunoglobulina en su parte extracelular (región de reconocimiento/unión de ligandos), un dominio transmembrana y un dominio intracelular de señalización con una inserción quinasa (Shibuya, 2001).

La dimerización del receptor tiene lugar en condiciones normales en respuesta a la unión de ligando y se produce auto/transfosforilación, desencadenando una cascada de señalización en la que se fosforilan distintas proteínas que regulan finalmente los mecanismos involucrados en la angio y linfangiogénesis (Dvorak, 2005). La sobreexpresión de receptores y ligandos o las mutaciones en los genes que codifican para moléculas receptoras pueden causar alteraciones en la estructura de la proteína que puede producir la activación independiente de ligando. Algunas alteraciones drásticas en la estructura del receptor pueden dar lugar incluso a receptores truncados solubles, consistentes únicamente en el dominio extracelular, que no serían activos en la transducción de señales, pero que sí son capaces de captar ligando, que no estaría de este modo disponible para unirse a receptores en la membrana, y por lo tanto tendrían efectos anti-angiogénicos (Kou *et al.*, 2004).



**Figura 7.** Familia de ligandos y receptores de VEGF (Hicklin and Ellis, 2005).

### 5.2.1. Ligandos de VEGF

- **VEGF-A**

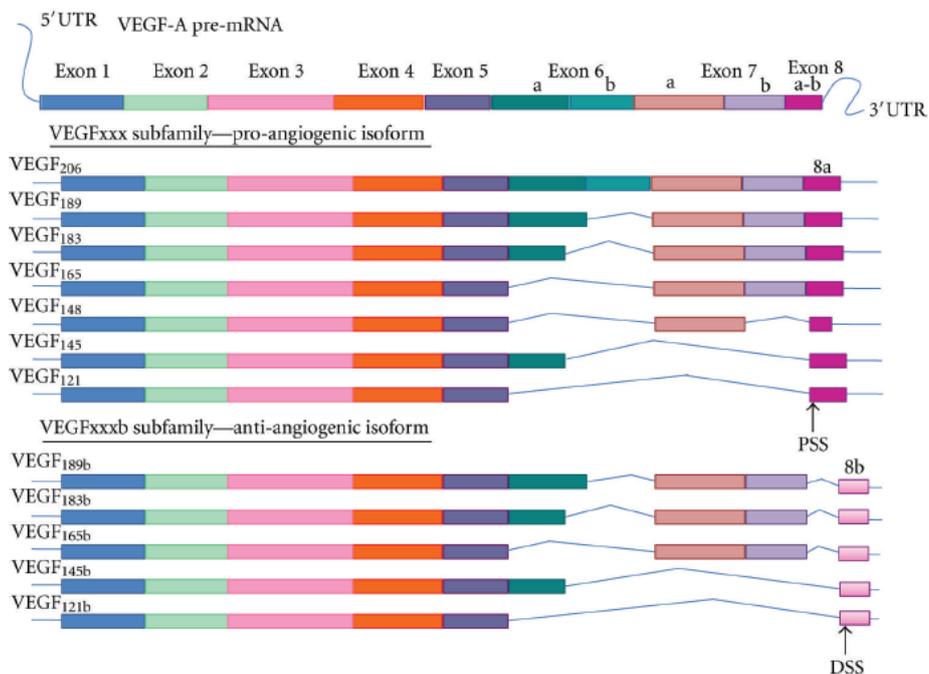
VEGF-A es el mayor mediador de la angiogénesis tumoral y normalmente es nombrado como VEGF. Fue identificado en los años 80 como un factor de permeabilidad vascular (VPF) y como un factor de crecimiento específico de las células endoteliales vasculares. Está codificado por el gen *VEGF*, por lo que ha sido referido como VEGF o VPF. El grupo de Senger fue el primero en purificar parcialmente esta proteína en 1983 (Senger *et al.*, 1983), aunque hasta 1989 no fue aislada completamente por los grupos de Ferrara (Ferrara and Henzel, 1989) y Connolly (Connolly *et al.*, 1989).

El gen humano de VEGF-A se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y está compuesto por ocho exones separados por siete intrones. Como resultado del procesamiento alternativo (*splicing*) del ARNm se han reportado diferentes isoformas, que difieren tanto en su masa molecular como en sus propiedades biológicas. Se designan con un número que denota el número de aminoácidos en la molécula. Las principales isoformas son VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>121</sub>. Hay además otras isoformas menores como son VEGF<sub>206</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>145</sub> y VEGF<sub>111</sub>, aunque sus funciones siguen sin estar claras (Hilmi *et al.*, 2012) (Figura 8).

El VEGF<sub>165</sub> es la isoforma más común y estudiada, además de ser el transductor de señales más fuerte entre los distintos tipos de VEGF. Es una molécula cargada positivamente que se une a heparina. Esta isoforma es principalmente secretada, sin embargo una fracción significativa permanece unida a la superficie celular y a la matriz extracelular. El VEGF<sub>121</sub> es una proteína soluble que no se une a heparina porque carece de los exones 6 y 7 que confieren la afinidad por la heparina, y difunde libremente en los tejidos, sirviendo como una señal guía de larga distancia para la migración direccional. Mientras que la isoforma VEGF<sub>189</sub> es una proteína unida a la matriz extracelular que se une a heparina con mayor fuerza que VEGF<sub>165</sub> y funciona en la atracción celular en un rango de acción corto (Dvorak, 2005).

Recientemente se han identificado nuevas isoformas de VEGF-A denominadas como VEGF<sub>xxx**b**</sub> que se han relacionado con un efecto antiangiogénico. La primera de estas variantes fue identificada por Bates *et al.* en el año 2002. Este grupo identificó en carcinoma de células renales, una variante de VEGF<sub>165</sub> denominada VEGF<sub>165b</sub>, que se expresa en la mayoría de los tejidos normales, mientras que está infraexpresada en los cánceres (Bates *et al.*, 2002). Después de la identificación de VEGF<sub>165b</sub> una nueva subfamilia de isoformas de VEGF<sub>xxx**b**</sub> fueron identificadas (Figura 8) (Hilmi *et al.*, 2012).

Desde entonces, algunas publicaciones han evaluado el posible papel antiangiogénico o al menos, menos angiogénico de las isoformas VEGF<sub>xxx**b**</sub> (Catena *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2007; Manetti *et al.*, 2011; Varey *et al.*, 2008; Woolard *et al.*, 2004). Por tanto, se postula que la relación entre las isoformas de VEGF-A, controlada por el procesamiento alternativo del ARNm, constituye una vía de regulación de la angiogénesis. Las isoformas proangiogénicas contienen el exón 8a, derivado del sitio proximal de procesamiento (PSS), que se sitúa al comienzo del exón 8; mientras que las denominadas isoformas antiangiogénicas, contienen el exón 8b, por la selección del sitio distal de procesamiento (DSS). Las isoformas VEGF<sub>206b</sub> y VEGF<sub>148b</sub> aún no se han identificado (Hilmi *et al.*, 2012).



**Figura 8.** Isoformas de procesamiento alternativo del RNAm de VEGF-A (Hilmi *et al.*, 2012). PSS: sitio proximal de *splicing*, DSS: sitio distal de *splicing*.

VEGF-A es ligando tanto del VEGFR-1 como del VEGFR-2, teniendo una afinidad por VEGFR-1 aproximadamente 10 veces mayor, pero debido a que sus propiedades de transducción de señal son menores, la señal de VEGF-A se produce mayoritariamente a través de VEGFR-2 (Kerbel, 2008).

La expresión de VEGF-A está regulada por la hipoxia a través del factor inducible por hipoxia (HIF-1), elemento clave mediador de las respuestas hipóxicas. Además de la hipoxia, otras vías de regulación de VEGF-A incluyen: factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias, hormonas y oncogenes (Ferrara, 2004b). La expresión *in vivo* de VEGF-A ha sido asociada con los principales pasos en la angiogénesis y vasculogénesis fisiológicas. Los experimentos en ratones han demostrado que la supresión del gen *VEGF-A* es letal, ya que resulta en defectos vasculares y anomalías cardiovasculares; mientras que la sobreexpresión genera abundante angiogénesis y psoriasis en la piel y acelera el crecimiento tumoral (Otrock *et al.*, 2007). En humanos, VEGF-A se expresa en prácticamente la totalidad de los tumores sólidos estudiados, así como en algunas enfermedades hematológicas (Ferrara *et al.*, 2003).

- **VEGF-B**

El gen humano de VEGF-B contiene ocho exones y seis intrones y se encuentra localizado en el cromosoma 11. La región promotora de *VEGF-B* es diferente respecto a la de *VEGF-A*, lo que podría explicar las diferencias en su regulación por estímulos fisiológicos, ya que pierde los dominios de interacción con HIF-1, impidiendo de este modo la regulación del gen por la hipoxia.

Actualmente se conocen dos isoformas de VEGF-B, VEGF-B<sub>167</sub> y VEGF-B<sub>186</sub>, cada una con 167 y 186 residuos de aminoácidos respectivamente. Estas isoformas difieren en la región C-terminal de la molécula, lo que les hace tener diferentes propiedades que afectan a la distribución de VEGF-B en el cuerpo. La isoforma VEGF-B<sub>167</sub> es capaz de unirse a proteoglicanos heparan sulfato, quedando en su mayoría retenida en la matriz extracelular; mientras que la isoforma VEGF-B<sub>186</sub> no contiene dominios de unión a heparina, lo que la hace difundir libremente. La isoforma VEGF-B<sub>167</sub> se expresa en la

mayoría de tejidos, principalmente en tejido cardíaco y músculo esquelético, y en mayor porcentaje que la isoforma VEGF-B<sub>186</sub>.

VEGF-B es ligando del VEGFR-1 y NRP-1, pero no de VEGFR-2 o VEGFR-3. La activación de su receptor induce una señal mitogénica pobre en las células endoteliales. Por otro lado, VEGF-B puede formar heterodímeros con VEGF-A, lo que podría representar un mecanismo para modular la liberación y disponibilidad de VEGF-A (Nash *et al.*, 2006;Otrock *et al.*, 2007).

Actualmente no se conoce claramente cuál es el papel de VEGF-B *in vivo*, aunque su función parece estar ligada al metabolismo energético de la célula. *In vitro* se ha observado que la ausencia de VEGF-B afecta a la arteriogénesis, a la respuesta pulmonar en condiciones de hipoxia y a la angiogénesis en procesos inflamatorios como la artritis (Otrock *et al.*, 2007).

- **VEGF-C**

El gen de VEGF-C se encuentra en el cromosoma 4 y consta de 7 exones. VEGF-C se produce como un precursor proteico y requiere procesamiento post-traduccional. Se activa proteolíticamente en el espacio extracelular para generar una proteína homodimérica sin uniones disulfuro con alta afinidad por VEGFR-2 y VEGFR-3 (Roy *et al.*, 2006). Tanto las formas maduras de VEGF-C como las parcialmente procesadas se unen al VEGFR-3 con gran afinidad, participando de forma importante en la regulación de la linfangiogénesis; mientras que sólo las formas completamente procesadas se unen al VEGFR-2 (Roskoski, Jr., 2007).

VEGF-C es un potente factor de permeabilidad e induce la mitogénesis, migración y supervivencia de las células endoteliales. Se encuentra expresado en corazón, intestino delgado, placenta, ovario y glándula tiroidea en adultos. La actividad de VEGF-C se ha observado preferentemente en la regulación de la linfangiogénesis en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento del endotelio linfático en adultos. Además, VEGF-C también está implicado en la regulación de la linfangiogénesis y el control de la función inmune en procesos inflamatorios y tumorales (Roskoski, Jr., 2007;Roy *et al.*, 2006).

- **VEGF-D**

VEGF-D es una glicoproteína secretada que estructuralmente tiene un 48% de homología con VEGF-C. El gen de VEGF-D humano se encuentra en el cromosoma X y contiene siete exones. Del mismo modo que VEGF-C, VEGF-D se sintetiza primeramente como una proteína precursora que se activa mediante procesamiento proteolítico de los extremos N-terminal y C-terminal. Aunque la forma precursora se une a VEGFR-3, importante en linfangiogénesis, la forma madura se une y activa tanto a VEGFR-2 como a VEGFR-3 (Roskoski, Jr., 2007; Roy *et al.*, 2006).

VEGF-D se ha encontrado expresado en multitud de tejidos incluyendo el endotelio vascular, corazón, músculo esquelético, pulmón e intestino. Induce la proliferación de las células endoteliales y muestra propiedades angiogénicas *in vitro* e *in vivo* (Roy *et al.*, 2006). Por tanto, VEGF-C y VEGF-D son elementos esenciales para el desarrollo del sistema linfático y pueden inducir la angiogénesis y aumentar la permeabilidad vascular.

VEGF-D parece tener un papel importante en la angiogénesis y linfangiogénesis tumoral, y su expresión se correlaciona con metástasis de nódulos linfáticos en cáncer colorrectal, pulmón y ovario, por lo que puede representar una potencial diana anticancerosa y antimetastásica (Roskoski, Jr., 2007).

- **PIGF**

El factor de crecimiento placentario (PIGF) es un miembro de la familia de VEGF que fue identificado por primera vez en la placenta, pero también se conoce que es expresado en corazón y pulmón, así como en diversas condiciones patológicas que incluyen el cáncer colorrectal y CPNM. El gen humano de PIGF se localiza en el cromosoma 14 y está codificado por siete exones. Se han descrito cuatro isoformas generadas por procesamiento alternativo, que son PIGF-1 (PIGF<sub>131</sub>), PIGF-2 (PIGF<sub>152</sub>), PIGF-3 (PIGF<sub>203</sub>) y PIGF-4 (PIGF<sub>224</sub>) que difieren además de en el tamaño, en las propiedades de secreción y afinidad de unión. PIGF-1 y PIGF-3 son isoformas que no se

unen a heparina y difunden libremente, mientras que PlGF-2 y PlGF-4 tienen dominios de unión a heparina (Roy *et al.*, 2006).

PlGFs median su efecto a través de la unión al VEGFR-1. PlGF-2 es capaz de unirse también a NRP-1 y NRP-2. La contribución de PlGF a la angiogénesis se produce a través de varios mecanismos: (1) acción directa sobre las células endoteliales a través de la unión a VEGFR-1, (2) por desplazamiento de VEGF-A del VEGFR-1, permitiendo así que VEGF-A active a VEGFR-2, (3) por estimulación vía VEGFR-1, que a su vez resulta en aumento de la sensibilidad de la acción de VEGF-A a través de VEGFR-2, (4) reclutamiento de monocitos y macrófagos que desempeñan un papel fundamental en el crecimiento de los vasos y (5) movilización de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Además, parece que PlGF también podría actuar inhibiendo la angiogénesis mediante la formación de heterodímeros PlGF/VEGF, ya que los análisis comparativos de la actividad mitogénica muestran que el heterodímero PlGF/VEGF es menos potente que las formas homodiméricas, por lo que podría representar un mecanismo para modular la disponibilidad de VEGF-A (Ribatti, 2008).

- **VEGF-E**

VEGF-E fue descubierto en el genoma de un parapoxivirus (Orf virus), que es un virus que causa dermatitis pustular contagiosa, afectando a ovejas, cabras y ocasionalmente a humanos. La infección del virus causa lesiones en la piel con proliferación y dilatación de capilares. Este miembro de la familia también es referido como orfVEGF y carece del dominio de unión a heparina. Distintos tipos de virus codifican para distintas variantes de VEGF-E capaces de estimular la proliferación de las células endoteliales y la permeabilidad vascular mediante la unión específica al VEGFR-2 y NRP-1 (Roy *et al.*, 2006).

- **VEGF-F**

Recientemente se ha descrito un séptimo miembro de la familia identificado en el veneno de varias víboras (Yamazaki *et al.*, 2003). VEGF-F representa a un grupo de proteínas nombradas como vammina que se unen selectivamente al VEGFR-2. Se ha encontrado que VEGF-F exhibe una potente actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo* comparado con VEGF-A<sub>165</sub>. Además contiene una corta región C-terminal de unión a heparina que funciona totalmente como un dominio activo de unión a heparina y el correspondiente péptido C-terminal de la vammina es capaz de bloquear de la actividad de VEGF-A<sub>165</sub> (Yamazaki *et al.*, 2005).

### 5.2.2. Receptores de VEGF

- **VEGFR-1**

VEGFR-1 (también conocido como Flt-1, *fms-like tyrosine kinase*) fue el primer receptor identificado de alta afinidad para VEGF. Es una glicoproteína transmembrana codificada en el cromosoma 13 y que contiene 30 exones (Roskoski, Jr., 2007). Se encuentra expresado en células endoteliales, así como en pericitos, placenta, trofoblastos, osteoblastos, monocitos, macrófagos, células renales y algunas células madre hematopoyéticas (Roy *et al.*, 2006).

VEGFR-1 se une con alta afinidad a los ligandos VEGF-A, VEGF-B y PlGF. Tiene mayor afinidad por VEGF-A que VEGFR-2 (aproximadamente 10 veces superior), pero por el contrario tiene una actividad de fosforilación TK más débil tras ser estimulado. También puede formar heterodímeros con VEGFR-2, con mayores propiedades de señalización. La activación de VEGFR-1 promueve la angiogénesis y se ha asociado con la quimiotaxis de monocitos y el reclutamiento y supervivencia de las células progenitoras derivadas de médula ósea. La expresión de VEGFR-1 se encuentra aumentada en condiciones de hipoxia, a diferencia del VEGFR-2 y VEGFR-3 (Roskoski, Jr., 2007).

El ARNm de VEGFR-1 puede generar por procesamiento alternativo una proteína más corta con únicamente seis dominios extracelulares de Ig y que resulta ser una

isoforma soluble (sVEGFR-1). Esta isoforma se encuentra presente en circulación y puede unir ligando inhibiendo la acción de VEGF (Roskoski, Jr., 2007).

- **VEGFR-2**

VEGFR-2 (Flk-1/KDR, *Fetal liver kinase-1/Kinase Domain-containing Receptor*) fue el segundo receptor de VEGF en ser identificado, codificado en el cromosoma 4. Se une con alta afinidad a VEGF-A y a formas maduras del VEGF-C y VEGF-D. Únicamente la forma glicosilada final de VEGFR-2 es capaz de autofosforilarse en respuesta a VEGF, siendo el principal transmisor de señales e induciendo vasodilatación, proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales. Aunque tiene menor afinidad por VEGF-A que VEGFR-1, exhibe una robusta actividad TK en respuesta a la unión del ligando. Este receptor se encuentra principalmente expresado en las células endoteliales, además de en células madre hematopoyéticas, megacariocitos y células progenitoras retinales (Roy *et al.*, 2006).

Igual que en el caso de VEGFR-1, se ha descrito una forma soluble y circulante para VEGFR-2 (sVEGFR-2). Esta isoforma trunca, que mantiene la afinidad de unión a ligando pero no puede activar la cascada de señalización ya que carece de dominio TK, puede tener implicaciones en la regulación de la angiogénesis (Ebos *et al.*, 2004).

- **VEGFR-3**

VEGFR-3 (Flt-4, *fms-like tyrosine kinase 4*) es una glicoproteína codificada en el cromosoma 5 que presenta solamente seis dominios de Ig, al ser liberado el quinto dominio proteolíticamente tras su biosíntesis y las cadenas resultantes unidas mediante puentes disulfuro. Existen dos isoformas de este receptor generadas por procesamiento alternativo, que difieren en el dominio C-terminal (Otrock *et al.*, 2007).

VEGFR-3 se encuentra presente en todo el endotelio durante el desarrollo embrionario, sin embargo, en el tejido adulto se encuentra restringido a las células endoteliales del endotelio linfático y a ciertas células endoteliales de las

fenestraciones del endotelio vascular. Además, en condiciones patológicas también se encuentra aumentado en las células del endotelio vascular de los tumores. VEGFR-3 y sus ligandos, VEGF-C y VEGF-D, están involucrados principalmente en la linfangiogénesis y también en la angiogénesis (Roy *et al.*, 2006).

### **5.3. Neuropilinas (NRP)**

Un segundo grupo de receptores afines a VEGF son las neuropilinas, compuesto por NRP-1 y NRP-2. Las neuropilinas están implicadas principalmente en el sistema inmune y el desarrollo neural, pero también en la angiogénesis formando parte de los complejos VEGFs/VEGFRs (Roy *et al.*, 2006). Son receptores glicoproteicos sin actividad quinasa ubicados en la superficie celular que se unen a semaforinas y a la familia de VEGF. NRP-1 se une a VEGF-A, VEGF-B y PlGF, mientras que NRP-2 se une a VEGF-A, VEGF-C y PlGF. Durante el desarrollo embrionario, NRP-1 se expresa en el sistema nervioso, cardiovascular y esquelético, mientras que en adultos también se expresa en las células endoteliales, algunas células tumorales, pulmón, corazón, hígado, riñón, páncreas, osteoblastos y células estromales de la médula ósea. NRP-2 tiene un patrón de expresión similar, y además también se ha visto expresado en las células del endotelio linfático (Otrock *et al.*, 2007).

Estas proteínas actúan como co-receptores aumentando la afinidad de VEGFR-2 por VEGF-A. Sin embargo, existen evidencias indicando que, al menos *in vitro*, NRP-1 podría mediar señalización por sí misma independiente de VEGFR-2, que conduciría a la migración de las células endoteliales aunque no a la proliferación (Dvorak, 2005).

## **6. Terapias antiangiogénicas**

La angiogénesis tumoral fue sugerida como objetivo terapéutico hace ya 40 años por Judah Folkman (Folkman, 1971b). Sin embargo, ha sido recientemente cuando se han añadido los inhibidores angiogénicos al arsenal terapéutico disponible en varios tumores como colon, mama, riñón, cerebro y otros.

Uno de los primeros inhibidores angiogénicos aprobado para el tratamiento del cáncer fue el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGF-A y cuya indicación inicial fue para carcinoma colorrectal avanzado. Bevacizumab es el agente antiangiogénico más estudiado en pacientes con CPNM. El ensayo clínico en fase III, ECOG 4599, en pacientes con CPNM de tipo no escamoso en estadios avanzados, comparó la administración de carboplatino-paclitaxel con y sin la adición de bevacizumab, mostrando resultados estadísticamente significativos para la rama con bevacizumab, lo cual permitió su aprobación para esta indicación (Sandler *et al.*, 2006). Posteriormente, se han evaluado otras combinaciones con bevacizumab, como es el caso del estudio AVAiL (combinación de bevacizumab con cisplatino-gemcitabina), el estudio BeTa-lung (combinación de bevacizumab y erlotinib) o combinaciones con quimio/radioterapia; pero estos no han logrado encontrar mejoras en la supervivencia de los pacientes (Bar and Goss, 2012).

VEGF-trap es otra molécula antiangiogénica en estudio. Se trata de una proteína recombinante de fusión similar a los dominios extracelulares de VEGFR-1 y VEGFR-2, que une todas las isoformas de VEGF. Actualmente se está probando en ensayos fase III su adición a docetaxel en segunda línea en diferentes tumores (Bar and Goss, 2012).

Otros agentes antiangiogénicos son las pequeñas moléculas TKI, que frecuentemente tienen como dianas múltiples receptores TK. Sunitinib es un inhibidor de VEGFR-1, VEGFR-3, PDGFRA, PDGFRB y del receptor c-Kit que ha sido aprobado para el tratamiento del tumor del estroma gastrointestinal y del carcinoma renal metastásico y está siendo testado actualmente para el tratamiento del CPNM. Sorafenib es otro TKI, aprobado para el tratamiento del carcinoma renal metastásico y del carcinoma hepatocelular, que fue diseñado inicialmente frente a Raf quinasa, pero se encontró que también inhibe a otras dianas entre las que está VEGFR-3. Sin embargo, un estudio en fase III que evaluaba su adición a la quimioterapia en cáncer de pulmón, no mostró ningún beneficio. Vandetanib es un inhibidor oral de VEGFR-2, VEGFR-3, Ret quinasa y EGFR, que fue concebido para bloquear sinérgicamente la angiogénesis y la proliferación tumoral. Sus resultados prometedores en estudios fase II permitieron su evaluación posterior en 4 estudios fase III, sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado mejoras en la supervivencia de los pacientes que recibieron

Vandetanib. Existen otras moléculas que funcionan como TKIs que tienen como diana los VEGFRs y que están siendo estudiados en ensayos fase II y III tales como: Motesanib, Cediranib, Pazopanib y Axitinib (Bar and Goss, 2012).

Por otro lado, otra alternativa para bloquear la angiogénesis son los anticuerpos anti-receptor, dirigidos frente al componente extracelular del receptor, que bloquean la interacción con ligando y la transducción de señal e inducen apoptosis. Ramucirumab sería un ejemplo de este tipo de terapia antiangiogénica que tiene como objetivo el VEGFR-2. El mecanismo de acción de estos agentes es diferente que el de TKI, por lo tanto en teoría, se podrían emplear de forma combinada (Bar and Goss, 2012).

## 7. Biomarcadores

Un biomarcador ha sido definido como una característica que es por un lado objetivamente medible y por otro, evaluable como indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta farmacológica/farmacodinámica frente a determinada intervención terapéutica (Atkinson *et al.*, 2001).

Los biomarcadores pueden dividirse en tres tipos fundamentales: (1) biomarcadores diagnóstico, entendidos como marcadores tumorales; (2) biomarcadores pronóstico, que se describen como aquellas características del paciente o del tumor que son indicativas de la biología del tumor y se correlacionan con el pronóstico del paciente sin tener en cuenta el tratamiento, representando el efecto del tumor sobre el paciente; y por último (3) biomarcadores predictivos, referidos como aquellas características del paciente o del tumor que pueden dar alguna información acerca de si el paciente se puede beneficiar de un tratamiento dado, por tanto representan el efecto del tratamiento en el tumor (Coate *et al.*, 2009).

En la práctica clínica de rutina en oncología las características de los pacientes tales como el estado funcional (ECOG-PS), el estadio de la enfermedad, el tipo histológico y otros exámenes de laboratorio son evaluados como marcadores que se asocian con el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Con los recientes avances en biología molecular, diversas tecnologías avanzadas, incluyendo la farmacogenómica, la transcriptómica, la proteómica, la metabolómica y el diagnóstico molecular por

imagen, se han introducido también en el ámbito clínico y potencialmente, pueden ofrecer un diagnóstico precoz, la caracterización precisa del tipo histológico y una visión más acertada del pronóstico de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento (Saijo, 2012). Es importante también remarcar que un biomarcador ideal debería ser detectable en el material clínico accesible, y es por ello que existe un creciente interés en el desarrollo de métodos no invasivos o mínimamente invasivos.

### **7.1 Biomarcadores en angiogénesis y linfangiogénesis**

Numerosos estudios han investigado la relación entre los niveles de diversos marcadores angiogénicos en relación con características clínico-patológicas y/o supervivencia de los pacientes con cáncer.

En 1996 se publicó el primer trabajo que estudió la expresión de VEGF en cáncer de pulmón, en el que se encontraba una asociación con la microdensidad de vasos (Mattern *et al.*, 1996). Durante el año siguiente, se demostró que la mayor expresión de VEGF en cáncer de pulmón se relacionaba con un peor pronóstico clínico (Mattern *et al.*, 1997; Volm *et al.*, 1997). Desde entonces, numerosos estudios en CPNM han analizado la expresión de VEGFs/VEGFRs asociados al pronóstico, mediante diferentes técnicas como IHQ, RT-PCR o inmunoensayos (Bremnes *et al.*, 2006; Salgia, 2011). La expresión o sobreexpresión de VEGF ha sido reportada en el 60% de los CPNM y la mayoría de estudios indican que hay una correlación positiva entre la presencia de VEGF y la vascularización del tumor (Zhu *et al.*, 2006). Además, en la gran mayoría de trabajos se ha encontrado una asociación con la progresión o la menor supervivencia de los pacientes (Bremnes *et al.*, 2006; Salgia, 2011), mientras que algunos estudios no han encontrado ninguna asociación (Baillie *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2001; Yano *et al.*, 2000). Si bien, aunque otros miembros de la familia también han sido estudiados, su relevancia es más controvertida, ya que de todas las moléculas examinadas como biomarcadores en CPNM, VEGF es el que se ha relacionado más consistentemente con la evolución de los pacientes (Salgia, 2011). Asimismo, según un meta-análisis de 2009, la sobreexpresión de VEGF tiene un impacto negativo en la supervivencia, con peor pronóstico para el subtipo adenocarcinoma (Zhan *et al.*, 2009). No obstante, una

isoforma de VEGF identificada recientemente (VEGF<sub>165b</sub>) podría relacionarse con propiedades antiangiogénicas (Bates *et al.*, 2002), lo cual necesita ser investigado más a fondo.

Por otro lado, también resulta interesante la relación entre los niveles de VEGF-C, VEGF-D y VEGFR-3 en relación con la linfangiogénesis y la capacidad de propagación de los tumores. Se ha reportado que los niveles de expresión de VEGF-C se correlacionan con la invasión de vasos linfáticos o la metástasis de nódulos linfáticos (Pepper *et al.*, 2003; Skobe *et al.*, 2001). Sin embargo, la relación entre la expresión de VEGF-D y su correlación con la metástasis es algo más controvertida en la bibliografía (Ko *et al.*, 2008; Maekawa *et al.*, 2007; Niki *et al.*, 2000; Yokoyama *et al.*, 2003).

Debido también a que la mayoría de los factores angiogénicos, como el VEGF, son solubles y con capacidad para difundir al ser secretados por los tumores, el interés por la identificación de marcadores circulantes que pueden ayudar tanto en el diagnóstico, estadificación, pronóstico, respuesta al tratamiento o seguimiento de los pacientes, se ha visto incrementado en los últimos años. Esto ofrece la ventaja de utilizar métodos no invasivos o mínimamente invasivos para la obtención de muestra. Varios marcadores angiogénicos en sangre, principalmente VEGF, han sido investigados como biomarcadores en cáncer de pulmón, mostrando resultados prometedores. (Ilhan *et al.*, 2004; Kaya *et al.*, 2004; Laack *et al.*, 2002; Roselli *et al.*, 2003; Sessa *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque los niveles circulantes pretratamiento de VEGF han sido evaluados en numerosos estudios y en general, se ha encontrado que los niveles elevados son indicativos de mal pronóstico, no ha sido demostrada todavía su utilidad para predecir la respuesta al tratamiento con terapias antiangiogénicas como bevacizumab (Sandler *et al.*, 2006).

## 8. Objetivos

Por todo lo expuesto anteriormente, y dada la implicación de la angiogénesis en la iniciación, mantenimiento y diseminación del cáncer, y en particular, en el cáncer de pulmón, la finalidad de este trabajo de investigación es analizar la expresión de marcadores relacionados con los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis en pacientes con CPNM y estudiar su asociación con características clínico-patológicas, con el fin de evaluar su utilidad como biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico en esta patología.

### Objetivos concretos:

1. Cuantificar los niveles plasmáticos de dos factores angiogénicos: VEGF-A y sVEGFR2 en pacientes afectados por CPNM y sujetos sanos mediante técnicas de inmunoensayo.
2. Determinar la expresión, a nivel de mRNA, de genes relacionados con los procesos de angiogénesis y/o linfangiogénesis en tejido de pacientes con CPNM en estadios resecables mediante RTqPCR.
3. Estudiar la expresión proteica de factores angiogénicos y/o linfangiogénicos en tejido de pacientes con CPNM en estadios resecables mediante Western blot y determinar la correlación con la expresión a nivel de mRNA.
4. Analizar la asociación entre los distintos marcadores moleculares estudiados con las características clínico-patológicas y demográficas de los pacientes tales como: sexo, edad, estadio, estado funcional, histología, estado mutacional del gen EGFR y respuesta al tratamiento.
5. Establecer perfiles o patrones moleculares que puedan relacionarse con el diagnóstico y/o pronóstico del CPNM y determinar su posible utilidad como biomarcadores.

## II. METODOLOGÍA



## **1. Pacientes y controles**

### **1.1. Cohorte A: pacientes con CPNM en estadios avanzados**

En el presente estudio se incluyeron 432 pacientes con CPNM en estadio avanzado procedentes de un estudio multicéntrico coordinado por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) que fue llevado a cabo entre Febrero de 2003 y Enero de 2005. Los criterios de selección fueron el diagnóstico de CPNM en estadio avanzado (IIIB con derrame pleural o IV) y que no hubieran recibido quimioterapia previa. Todos los individuos aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron el correspondiente consentimiento informado. El estudio se llevó a cabo en conformidad con la Declaración de Helsinki y los requisitos regulatorios y las leyes locales. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV).

Los pacientes incluidos en el estudio clínico fueron tratados con un régimen de quimioterapia basado en cisplatino (75mg/m<sup>2</sup>) y docetaxel (75mg/m<sup>2</sup>) en el día 1 del ciclo cada 3 semanas y fueron re-estadiados para las respuestas objetivas tras los primeros tres ciclos de quimioterapia. Los pacientes con respuesta completa, parcial o estabilización, continuaron el tratamiento hasta progresión de enfermedad o por un máximo de 8 ciclos en ausencia de toxicidad inaceptable; mientras que los pacientes que progresaron antes o en la primera evaluación, pasaron a recibir un tratamiento en segunda línea. Las respuestas fueron categorizadas en función de los criterios RECIST (Therasse *et al.*, 2000).

### **1.2. Cohorte B: pacientes con CPNM en estadios iniciales**

175 pacientes con CPNM resecable procedentes del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) fueron incluidos en el estudio entre los años 2004 y 2011. Los criterios de selección fueron el diagnóstico de CPNM en estadio temprano y no haber recibido ningún tratamiento previo a la cirugía. Todos los individuos aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron el correspondiente consentimiento informado. El estudio se llevó a cabo en conformidad con la

Declaración de Helsinki y los requisitos regulatorios vigentes a nivel nacional. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del CHGUV.

### **1.3. Grupo control**

El grupo control consistió en 89 voluntarios sanos anónimos, emparejados por edad y sexo y sin ningún tipo de enfermedad inflamatoria aguda o crónica, que aceptaron donar sus muestras para investigación tras la firma del consentimiento informado. Las muestras del grupo control fueron tomadas en el CHGUV a lo largo del mismo periodo que las muestras de los pacientes.

## **2. Muestras a estudiar**

### **2.1. Sangre periférica: plasma**

Se obtuvieron muestras de sangre de los sujetos de estudio, tanto pacientes como controles, mediante venopunción. En el caso de los pacientes en estadios avanzados las muestras sanguíneas se tomaron antes del primer ciclo de quimioterapia, mientras que en los pacientes en estadios tempranos se tomaron antes de la cirugía. Se recogieron 10 ml de sangre periférica en tubos que contenían EDTA como anticoagulante (*BD Vacutainer®*) para la obtención de plasma sanguíneo. Estos tubos fueron enviados al laboratorio dentro de las 24 horas siguientes a la recolección de la sangre. Las muestras sanguíneas fueron sometidas a dos pasos consecutivos de centrifugación: una centrifugación de 10 minutos a 1100 g y una segunda centrifugación del sobrenadante de 10 minutos a 2000 g a temperatura ambiente, con el fin de eliminar cualquier posible resto celular. Las alícuotas de plasma obtenidas tras la centrifugación fueron inmediatamente conservadas en criotubos a -80°C hasta el momento de su utilización.

## 2.2. Muestras de tejido pulmonar

Las muestras de tejido pulmonar fueron obtenidas de los pacientes sometidos a resección quirúrgica (cohorte B, 175 pacientes en estadios iniciales). Una vez obtenidas las piezas quirúrgicas, fueron inmediatamente analizadas por un patólogo, el cual seleccionó dos muestras para realizar los análisis moleculares: una correspondiente a tejido tumoral y otra de tejido normal adyacente lo más alejada posible de la localización del tumor. Dichas muestras se preservaron en RNAlater® (*Applied Biosystems*) y se congelaron a -80°C para evitar la degradación del ARN, hasta el momento de su procesamiento. Todas las muestras disponían de un estudio anatomopatológico para su correcta caracterización. Se incluyeron en este estudio todos los tipos histológicos del CPNM.

## 3. Inmunoensayos para la determinación de VEGF-A y sVEGFR-2

La cuantificación de los niveles circulantes de dos factores angiogénicos, VEGF-A y sVEGFR2, fue llevada a cabo mediante ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) en pacientes afectados por CPNM y sujetos sanos. Las muestras de plasma sanguíneo se descongelaron en hielo y las concentraciones de VEGF-A y sVEGFR-2 se determinaron en paralelo empleando un ELISA tipo sándwich (*DuoSet, R&D Systems Inc.*) siguiendo las indicaciones del fabricante, requiriendo 200 µl de plasma de cada sujeto estudiado. Las muestras con volumen insuficiente, hemolizadas o lipémicas fueron descartadas del análisis inmunoenzimático.

La determinación de sVEGFR-2 se realizó en 432 pacientes con CPNM en estadios avanzados, 62 pacientes en estadios tempranos y 89 sujetos sanos. Para la cuantificación de sVEGFR-2 las muestras de plasma se diluyeron 1:25 en 1% de seroalbúmina bovina (BSA) (*Sigma*) en PBS. La curva estándar para sVEGFR-2 cubría un rango de 0 a 1000 pg/ml, con un punto estándar inferior de concentración 15.6 pg/ml.

La determinación de VEGF-A se realizó en 388 pacientes afectados por CPNM en estadios avanzados, 62 pacientes en estadios tempranos y 77 sujetos sanos (en 44 pacientes en estadios avanzados y 12 sujetos sanos se realizó la determinación de

sVEGFR-2 pero no se disponía de plasma suficiente para la cuantificación de VEGF-A). La curva estándar de VEGF-A cubría un rango de 0 a 2000 pg/ml, con un punto estándar inferior de concentración 31.2 pg/ml.

La cuantificación tanto de VEGF-A como de sVEGFR-2 se realizó por duplicado para cada una de las muestras. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos que fueron incubadas toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo de captura correspondiente (diluido a la concentración apropiada en PBS). Tras esta incubación se lavó cada pocillo tres veces con 400  $\mu$ l de solución de lavado (PBS/0.05% Tween 20) y a continuación se realizó el bloqueo de los sitios de unión no específicos de la placa durante una hora a temperatura ambiente con 1% de BSA (*Sigma*) en PBS. Seguidamente se repitió el lavado de los pocillos y se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de las muestras y estándares correspondientes y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Tras tres lavados, se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo del anticuerpo de detección biotinilado y se incubó otras 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un nuevo lavado y se adicionaron 100  $\mu$ l por pocillo de la solución de estreptavidina-HRP que se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegiendo la placa de la luz. Después de otro lavado, se incubó con 100  $\mu$ l por pocillo de solución de sustrato (*R&D Systems Inc.*) durante 30 minutos, seguido de la adición de un reactivo de parada de la reacción.

La determinación de la densidad óptica de cada pocillo se realizó inmediatamente mediante un lector de microplacas (*Victor3<sup>TM</sup>-1420 multilabel contador, Perkin Elmer*). El cálculo de los resultados se efectuó tras la medida de las lecturas de la densidad óptica a 450 nm para cada estándar y muestra problema, restando la corrección de la lectura a 540 nm y el estándar de concentración cero. La recta patrón se calculó a partir de la media obtenida para cada estándar con el programa *GraphPad Prism 5*, mediante un ajuste polinomial de tercer orden de los datos. Tras la obtención de la recta patrón, se obtuvo para cada muestra problema la concentración de VEGF-A y sVEGFR-2 (multiplicando en este último caso los datos por el factor de dilución, x25).

#### **4. Extracción de ARN y ADN a partir de las muestras tisulares**

La extracción del ARN y ADN de las 175 muestras de tejido tumoral y muestras de tejido pulmonar sano adyacente se realizó utilizando *TriReagent*<sup>®</sup> (*Sigma*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, una pequeña pieza de tejido de aproximadamente 10-20 mg fue diseccionada con la ayuda de un bisturí estéril y colocada en un tubo de rosca con 1 mL de *TriReagent*<sup>®</sup>. La homogeneización se llevó a cabo mediante el uso de *Tissue Lyser*<sup>®</sup> (*Qiagen*) y seguidamente se añadió a las muestras cloroformo con el fin de poder separar la fase acuosa que contiene el ARN y la interfase blanca de ADN.

A continuación, se precipitó el ARN con isopropanol y se realizaron dos lavados con etanol al 75%. Finalmente, el ARN se resuspendió en agua libre de nucleasas (*Qiagen*) y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

La interfase correspondiente al ADN se recogió en etanol 100% y se realizaron tres lavados con solución de lavado (10% etanol/0.1M citrato sódico) y a continuación dos lavados más con etanol 75%. Por último se resuspendió el ADN en agua libre de nucleasas<sup>®</sup> (*Qiagen*) y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

La cuantificación del ADN y ARNm obtenidos en cada muestra se realizó mediante un nanoespectrofotómetro (*NanoDrop 2000C, Thermo Fisher Scientific*). Paralelamente a esto, para valorar la calidad del ARNm, se evaluó su integridad y tamaño mediante un análisis electroforético, empleando un bioanalizador con una plataforma basada en microfluidos, usando el chip *Agilent RNA 6000 Nano (Agilent 2100, Agilent Technologies)*.

#### **5. Determinación del estado mutacional del gen *EGFR***

Para el análisis del estado mutacional del gen *EGFR* se utilizó un kit comercial, *TheraScreen EGFR RGQ PCR (Qiagen)*, que detecta 29 mutaciones somáticas en el oncogén *EGFR* localizadas en los exones 18-21 (Tabla 3) mediante PCR a tiempo real

combinada con tecnologías ARMS y Scorpions. Esta técnica presenta alta sensibilidad y especificidad de detección.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con un volumen final de 12.5  $\mu\text{l}$  por reacción, de los cuales, 9.75  $\mu\text{l}$  correspondían a la mezcla de reacción (conteniendo cebadores, sondas, dNTPs y buffer de reacción con  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ), 0.25  $\mu\text{l}$  de Taq Polimerasa y 2.5  $\mu\text{l}$  de muestra a concentración de 2 -10  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . En el análisis se incluyeron tanto controles positivos como controles negativos de cada ensayo. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador *LightCycler 480 II* (Roche), según las condiciones de amplificación detalladas en la Tabla 4.

**Tabla 3.** Mutaciones del gen *EGFR* detectadas

Exón	Mutación
19	19 deleciones (no distingue entre las mismas)
20	T790M
21	L858R
21	L861Q
18	G719X (G719S, G719A y G719C, no distingue entre las mismas)
20	S768I
20	3 inserciones (no distingue entre las mismas)

**Tabla 4.** Programa de tiempos y temperaturas en la PCR para el análisis mutacional de *EGFR*.

Fase	Duración	Temperatura
1	15 minutos	95 °C
2	30 segundos	95 °C
(40 ciclos)	1 minuto	60 °C
3	30 segundos	40°C

Una vez finalizada la PCR se procedió al análisis de los datos mediante el cálculo de los valores de  $\Delta\text{Cq}$  de las muestras, siendo el  $\Delta\text{Cq}$  la diferencia entre el valor de  $\text{Cq}$  de cada ensayo de mutación y el valor de  $\text{Cq}$  del ensayo control de una misma muestra. Las muestras se clasificaron como positivas para una mutación si su valor de  $\Delta\text{Cq}$  era inferior al valor de corte de  $\Delta\text{Cq}$  indicado por el kit comercial (Tabla 5), que es

diferente para cada mutación. Por encima de este valor, se consideró que la muestra era negativa para la mutación.

**Tabla 5.** Valores de corte de  $\Delta Cq$  para cada mutación de *EGFR* analizada.

Ensayo	$\Delta Cq$
T790M	6.38
Deleciones	9.06
L858R	8.58
L861Q	9.26
G719X	9.31
S768I	9.26
Inserciones	7.91

## 6. Transcripción reversa

A partir del ARN extraído de las muestras titulares se realizó la reacción de retrotranscripción (RT) para la síntesis del ADN complementario de cadena simple (ADNc). La reacción se llevó a cabo a partir de 1  $\mu$ g de ARN total para un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l, utilizando el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Applied Biosystems) que usa hexámeros al azar y empleando un Termociclador *Mastercycler* (Eppendorf), según las instrucciones del fabricante. Las condiciones para el termociclador se detallan en la Tabla 6. Terminada la RT, las muestras de ADNc se congelaron inmediatamente a -20°C hasta su utilización.

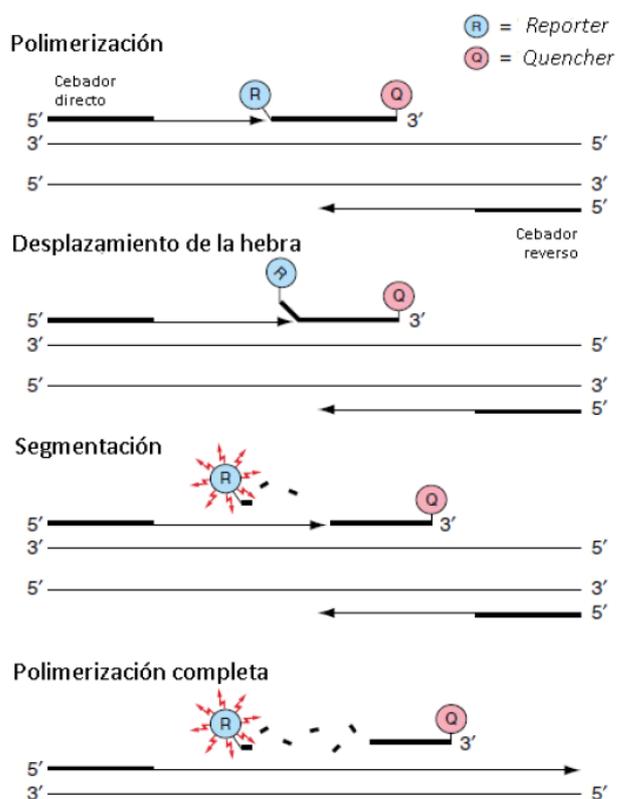
**Tabla 6.** Programa de tiempos y temperaturas utilizados en la Transcripción reversa

Pasos	Duración	Temperatura
1	10 minutos	25 °C
2	2 horas	37 °C
3	5 segundos	85 °C

## 7. PCR cuantitativa a tiempo real

La cuantificación de los transcritos de los genes problema se llevó a cabo mediante la reacción de PCR cuantitativa en tiempo real (RTqPCR) usando sondas de hidrólisis específicas marcadas con el fluorocromo 6-carboxifluoresceína (FAM). En la Figura 9 se muestra el mecanismo de fluorescencia usado por este tipo de sondas. En nuestro estudio, para la detección de fluorescencia, se emplearon sistemas de fluorescencia Taqman® MGB (*Applied Biosystems*) que permite el diseño de sondas de menor tamaño.

**Figura 9.** Mecanismo de fluorescencia de las sondas de hidrólisis



Los niveles de expresión de los genes se determinaron usando ensayos *TaqMan*® *Gene Expression Assay* (*Applied Biosystems*) correspondientes a los genes a analizar (Tabla 7A). Como gen de control endógeno (*housekeeping*), se analizó la expresión del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (*GUSB*). En este caso, se usó FAM como *reporter* y, como *quencher*, la tetrametilrodamina (TAMRA™). Los cebadores y la sonda para *GUSB* y VEGF-A<sub>165b</sub> se diseñaron en el laboratorio (Tabla 7 B).

**Tabla 7. A).** Ensayos *TaqMan*<sup>®</sup> empleados en la RTqPCR. **B)** Cebadores y sonda diseñados para los genes *VEGF-A<sub>165b</sub>* y *GUSB*

<b>A</b>	<b>Gen</b>	<b>Tamaño del amplicón (pb)</b>	<b>Código del ensayo</b>
	<i>VEGF-A</i>	60	Hs00900054_m1
	<i>VEGF-B</i>	69	Hs00173634_m1
	<i>VEGF-C</i>	66	Hs01099203_m1
	<i>VEGF-D</i>	130	Hs00189521_m1
	<i>PIGF</i>	56	Hs00182176_m1
	<i>VEGFR-1</i>	55	Hs00176573_m1
	<i>VEGFR-2</i>	65	Hs00911708_m1
	<i>VEGFR-3</i>	58	Hs01047678_m1
	<i>NRP-1</i>	60	Hs00826125_m1
	<i>NRP-2</i>	69	Hs01033069_m1
	<i>HIF-1A</i>	76	Hs00153153_m1

<b>B</b>	<b><i>VEGF-A<sub>165b</sub></i> (Tamaño del amplicon: 94 pb)</b>
	Cebador directo: 5' TAA ATG TTC CTG CAA AAA CAC ACA CT 3'
	Cebador reverso: 5' TCA GTC TTT CCT GGA GAG AGA TCT G 3'
	Sonda: 5' - 6-FAM-AGC TTG AGT TAA ACG AAC- MGB-3'

<b>B</b>	<b><i>GUSB</i> (Tamaño del amplicon: 98 pb)</b>
	Cebador directo: 5' GAA AAT ATG TGG TTG GAG AGC TCA TT 3'
	Cebador reverso: 5' CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A 3'
	Sonda: 5' - 6-FAM-CCA GCA CTC TCG TCG GTG ACT GTT CA-TAMRA-3'

Los ensayos se realizaron por duplicado en placas de 384 pocillos, con un volumen final de reacción de 5 µl y con la siguiente proporción de reactivos: 2,5 µl de *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), 1,25 µl de agua, 0,25 µl de cebadores/sondas *TaqMan*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*), y 1 µl de ADNc proveniente de una dilución 1:4 del productor de RT. Se incluyeron controles negativos de la extracción, de la retrotranscripción y de la RTqPCR y se utilizó la línea celular humana NCI-H23, derivada de un CPNM, (ATCC Number: CRL-5800<sup>TM</sup>) y Jurkat, derivada de linfocitos T (ATCC Number: TIB-152<sup>TM</sup>) como referencia o calibrador. Las muestras en que se observaron diferencias de Cqs  $\geq 1$  entre las réplicas para un ensayo fueron repetidas o

los datos descartados. El equipo utilizado fue el *7900 HT Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*) con el programa de ciclos de temperaturas optimizado (Tabla 8).

**Tabla 8.** Programa de ciclos empleado para la RTqPCR

	Fase	Duración	Temperatura
<b>Pre-PCR</b>	<i>AmpErase UNG</i>	2 minutos	50°C
	<i>Hot Start</i>	10 minutos	95°C
<b>PCR</b> (40 ciclos)	<i>Desnaturalización</i>	15 segundos	95°C
	<i>Unión/Extensión</i>	1 minuto	60°C

Para calcular la eficiencia de la reacción de RTqPCR, se realizó una curva de diluciones seriadas (50 ng/μl, 5 ng/μl, 0.5 ng/μl, 0.05 ng/μl y 0.005 ng/μl) a partir de un ADNc de referencia (*qPCR Human Referente cDNA random-primed, Clontech*) para cada reacción de amplificación. Aplicando la siguiente relación,  $E = (10^{-1/\text{pendiente}})$ , obtuvimos directamente el valor de la eficiencia de amplificación para cada reacción.

Para la cuantificación de la expresión génica relativa se usó el método matemático desarrollado por *Michael W. Pfaffl* (Pfaffl, 2001). Este método se basa en la cuantificación relativa de la expresión del gen problema en tejido tumoral respecto a su expresión en tejido normal. Así mismo, los valores se normalizaron calculando un ratio entre el gen problema en comparación con un gen de referencia endógeno (en este caso *GUSB*). Otra característica del método es que tiene en cuenta la eficiencia de la amplificación, que se calculó utilizando un ADNc de referencia (*qPCR Human Referente cDNA random-primed, Clontech, EEUU*). El modelo matemático de *Pfaffl* es el siguiente:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

## 8. Inmunoblot

Para el análisis de los niveles de proteínas en tejido tumoral y tejido sano, se diseccionó una pequeña pieza de tejido con la ayuda de un bisturí estéril, luego se homogeneizó usando un homogeneizador automático y se resuspendió en tampón de lisis (50mM TrisHCl pH=8, 150mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.1% Dodecilsulfato sódico (SDS), 1% Igepal CA-630 (NP40), 0.5% Deoxicolato de sodio (DOC) (todos de Sigma) al que previamente se añadieron inhibidores de proteasas (*complete protease inhibitor cocktail tablets 1x, Roche*). Tras incubar el lisado durante 30 minutos en hielo, se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (*Bradford Reagent, Sigma*) para lo cual se preparó una curva estándar a partir de diluciones seriadas con BSA (*Sigma*). La lectura de la densidad óptica se realizó mediante un lector de microplacas (*Victor3™ -1420 multilabel contador, Perkin Elmer*) a 595 nm.

La separación de proteínas se realizó a partir de 50 µg mediante SDS-PAGE poliacrilamida del 12-15 % en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se incubaron a 95-100°C durante 5 minutos una vez diluidas con el tampón de carga (50mM Tris pH=6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1M DTT y azul de bromofenol). La electroforesis se llevó a cabo a 85 V durante 15 minutos, y una vez las muestras entraron en el gel separador, se subió a un voltaje constante de 150 V. Se empleó un marcador de pesos moleculares pre-teñido (*Rainbown Molecular Weight Markers, Amersham, GE Healthcare*).

A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF) (*Immobilion®-P, Millipore*) por transferencia húmeda a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora a 4°C. Al terminar, se comprobó la eficiencia de la transferencia de proteínas por tinción reversible con rojo-Ponceau (0,5% rojo-ponceau, 1% ácido acético glacial) (*Sigma*). Seguidamente la membrana se bloqueó en 5% de leche desnatada (PBS/0.05% Tween 20/5% leche) para evitar uniones inespecíficas entre el anticuerpo primario y las proteínas retenidas en la membrana durante al menos 1 hora. A continuación, se lavó la membrana con solución de lavado (PBS/0.05%

Tween 20) y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 9) diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C, a excepción de ACTB que se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso de anticuerpo, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (Tabla 9), diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres nuevos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente. La detección de la señal se llevó a cabo por quimioluminiscencia (*ECL Western Blotting Analysis System, Amersham, GE Healthcare*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Como controles positivos para la detección de VEGF-A se emplearon la línea celular humana MCF-7 (ATCC Number: HTB-22<sup>TM</sup>), derivada de cáncer de mama y la proteína recombinante de VEGF<sub>165</sub> (*Recombinant human VEGF 165, R&D Systems Inc.*); para VEGF-B y VEGF-C se usó la línea celular MCF-7; y para PIGF, se usó un extracto proteico derivado de placenta humana.

**Tabla 9.** Anticuerpos utilizados para el análisis por Western blot

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Referencia	Fabricante
PIGF	Conejo	1:500	ab9542	Abcam
VEGF-A	Conejo	1:500	sc-152	Santa Cruz
VEGF-B	Ratón	1:250	MAB751	R&D Systems
VEGF-D	Ratón	1:250	MAB286	R&D Systems
ACTB	Ratón	1:10000	A5441	Sigma
Anticuerpo secundario	Conjugado	Dilución	Referencia	Fabricante
Anti-conejo IgG	Peroxidasa	1:5000	sc-2313	Santa Cruz
Anti-ratón IgG	Peroxidasa	1:5000	A9044	Sigma

## 9. Análisis estadístico de los datos

La finalidad que se planteaba en este estudio era analizar y correlacionar los resultados experimentales obtenidos a partir de la cuantificación de los niveles circulantes de los marcadores angiogénicos, así como de la expresión génica relativa de los marcadores estudiados en tejido, con las variables clínico-patológicas más relevantes de los pacientes (sexo, edad, TNM, estadio, histología, evolución clínica, tiempo de progresión y tiempo de supervivencia entre otros).

Primero se comprobó mediante la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* que muchas de las variables no seguían una distribución normal y por ello, se aplicó al estudio estadística de tipo no paramétrica. Se empleó por tanto, la prueba de *Mann-Whitney* para la comparación de dos grupos independientes y la prueba de *Kruskall Wallis* para la comparación de más de dos grupos independientes.

Además, se analizaron las correlaciones entre variables a través del Coeficiente de correlación de *Spearman* (no paramétrico) y se utilizaron las Tablas de Contingencia para analizar las relaciones de dependencia o independencia entre variables cualitativas de carácter bidimensional, evaluándose con la prueba de  $\chi^2$ . Para ello, las variables continuas, como los niveles de expresión génica, se transformaron en variables dicotómicas.

La evaluación de la precisión de los parámetros en el diagnóstico del CPNM se realizó mediante la curva de rendimiento diagnóstico (ROC) y el área bajo la curva (AUC). Las diferencias entre las curvas ROC se calcularon de acuerdo a los métodos *DeLong* (*DeLong et al.*, 1988) y los intervalos de confianza para las AUC de acuerdo con el método de *Hanley y McNeil* (*Hanley and McNeil*, 1982). El valor de corte para la discriminación entre los grupos se seleccionó usando el índice de Youden (*Youden*, 1950).

Los análisis de supervivencia se realizaron de acuerdo con el método de *Kaplan-Meier* y las diferencias entre los grupos se evaluaron con el estadístico de contraste log-rango. La supervivencia global (SG) se calculó a partir de la fecha de la cirugía hasta la fecha de fallecimiento o último seguimiento del paciente; el tiempo hasta la progresión (TLP) se calculó a partir de la fecha de la cirugía hasta la progresión de la

enfermedad (evaluada según criterios RECIST) (Therasse *et al.*, 2000) o último seguimiento. El análisis multivariante para valorar los factores de pronóstico independiente se realizó según el método de regresión de *Cox*, incluyéndose todas las variables que fueron significativas en el análisis univariante.

Para la generación de una firma genética se creó una ecuación con tres genes, otorgando a cada uno de ellos un valor o peso específico que se asignó en función del *Hazard Ratio* (HR) para estos genes obtenido a partir de un modelo multivariante de *Cox* para el TLP.

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. En el caso de comparaciones múltiples, se aplicó el método de Bonferroni para corregir el nivel de corte en función del número de contrastes efectuados ( $\kappa p < 0.05$ , donde  $\kappa$  es el número de subgrupos o contrastes) y mantener así la probabilidad global de  $p < 0.05$  (Bland and Altman, 1995).

### **III. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**



## 1. Capítulo I. Marcadores solubles

### 1.1. Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de la población

#### 1.1.1. Cohorte A: pacientes con CPNM en estadios avanzados

Se analizaron los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2 en 432 pacientes en estadios avanzados, procedentes de un estudio multicéntrico coordinado por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP). Las principales características de esta cohorte de pacientes se resumen en la Tabla 10. La edad mediana fue de 59 años y la mayoría eran varones. El subtipo histológico predominante fue el adenocarcinoma (50.2%), seguido del epidermoide (30.8%). El 84.3% de los pacientes estaban en estadio IV y la mayoría presentaban un PS = 1.

**Tabla 10.** Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes. Cohorte en estadios avanzados.

	N	%
<b>Total</b>	432	100
<b>Edad (años)</b>		
Mediana	59	
Rango	31-80	
<b>Sexo</b>		
Hombre	361	83.6
Mujer	71	16.4
<b>Histología</b>		
Adenocarcinoma	217	50.2
Epidermoide	133	30.8
Células grandes	66	15.3
Otros	16	3.7
<b>Estadio</b>		
IIIB	68	15.7
IV	364	84.3
<b>ECOG-PS</b>		
0	107	24.8
1	317	73.4
2	6	1.4
No disponible	2	0.5
<b>Respuesta</b>		
Respuesta completa	3	0.7
Respuesta parcial	104	24.1
Enfermedad estable	141	32.6
Progresión de enfermedad	152	35.2
No disponible	32	7.4

### 1.1.2. Cohorte B: pacientes con CPNM en estadios iniciales

Se analizaron los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2 en 62 pacientes en estadios iniciales de los 175 pacientes inicialmente incluidos en el estudio que fueron intervenidos de resección quirúrgica en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV), ya que no se disponía de muestra sanguínea o ésta no fue suficiente u óptima para el análisis del resto de los pacientes.

Las principales características clínico-patológicas y demográficas de este grupo de pacientes se resumen en la Tabla 11. La edad mediana de los pacientes fue de 61.5 años, el 90.3% eran varones y el subtipo histológico predominante fue el epidermoide. El 50 % de los pacientes estaban en estadio I de enfermedad, la mayoría (71%) presentaban un PS =0 y solamente 2 pacientes (3.2%) eran no fumadores. Con respecto al tratamiento postoperatorio, un 59.7% no recibieron ningún tratamiento adyuvante, un 22.6% recibió quimioterapia postoperatoria (basada en dobletes de platino y sin ninguna terapia biológica adicional) y un 17.7% recibieron una combinación de quimio/radioterapia.

Las mutaciones de *EGFR* fueron analizadas en 29 de estos 62 pacientes (48%), entre los cuales se detectaron 2 pacientes con la mutación (uno presentaba la mutación en el exón 21 y el otro en el exón 20). Los pacientes mutados eran un hombre y una mujer, los dos pertenecían al grupo de edad  $\leq 65$  años y presentaban histología adenocarcinoma. Uno de ellos era exfumador y el otro no fumador. Por tanto, ambos pacientes tenían características que se correspondían con las más frecuentemente descritas asociadas a la mutación de *EGFR*, ya que presentaban histología adenocarcinoma y no eran fumadores activos (Rosell *et al.*, 2009).

**Tabla 11.** Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes. Cohorte en estadios iniciales.

	N	%
<b>Total</b>	62	100
<b>Edad (años)</b>		
Mediana	61.5	
Rango	37-85	
<b>Sexo</b>		
Hombre	56	90.3
Mujer	6	9.7
<b>Histología</b>		
Adenocarcinoma	21	33.9
Epidermoide	30	48.4
Células grandes	2	3.2
Otros	9	14.5
<b>Estadio</b>		
I	31	50
II	17	27.4
IIIA	14	22.6
<b>ECOG-PS</b>		
0	44	71.0
1	16	25.8
2	2	3.2
<b>EGFR</b>		
Nativo	27	43.6
Mutado	2	3.2
No disponible	33	53.2
<b>Tabaquismo</b>		
No fumador	2	3.2
Exfumador	23	37.1
Fumador activo	37	59.7
<b>Tratamiento postoperatorio</b>		
No	37	59.7
Quimioterapia	14	22.6
Quimioterapia/Radioterapia	11	17.7

### 1.1.3. Grupo control

Se analizaron los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2 en 89 voluntarios sanos que aceptaron donar sus muestras para investigación. En el grupo control la edad mediana fue de 57.2 años (32-88) y el 77% eran varones. Una posible limitación del estudio, sería la falta de datos clínicos del grupo control, como la exposición profesional, el hábito tabáquico o la función pulmonar.

## 1.2. Niveles plasmáticos de VEGF-A y sVEGFR-2

La evaluación de marcadores angiogénicos en sangre periférica presenta potencialmente una serie de ventajas frente a la evaluación en el tejido tumoral de los pacientes, dado que permite acceder a material biológico de manera mínimamente invasiva, monitorizar a los pacientes a lo largo del curso de la enfermedad y, sobre todo, permite evaluar a todos los individuos, dispongan o no de espécimen quirúrgico o biopsia. Esta ventaja es altamente importante para los pacientes diagnosticados de CPNM avanzado, ya que al no someterse a intervención quirúrgica, la disponibilidad de tejido en estos casos es muy limitada (Hanash *et al.*, 2011). Además, la evaluación de marcadores angiogénicos circulantes presenta algunas ventajas más, como el bajo coste en comparación con otras metodologías, el menor tiempo invertido en el desarrollo analítico, la fácil reproducibilidad y que permite evaluar la actividad angiogénica pre-operatoria y las evaluaciones sucesivas si fueran requeridas.

Kondo y colaboradores fueron los primeros en reconocer el potencial de VEGF medido en suero como marcador diagnóstico en pacientes con cáncer (Kondo *et al.*, 1994). Los marcadores angiogénicos circulantes son fácilmente evaluables y, teóricamente, pueden reflejar la actividad angiogénica del tumor. Los niveles proteicos de VEGF-A o VEGFRs circulantes se han relacionado con la carga tumoral en diversos tipos de cáncer (Bocci *et al.*, 2004; Brattstrom *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2005; Dunst *et al.*, 2001; Ebos *et al.*, 2008; Imoto *et al.*, 1998; Karayiannakis *et al.*, 2002), lo cual parece indicar que la medición de los cambios en las concentraciones de estos marcadores angiogénicos en sangre podría ayudar en el diagnóstico, estadificación, seguimiento, predicción de la respuesta al tratamiento y pronóstico del cáncer. Pero es importante también tener en cuenta que el estroma asociado al tumor, así como otros tejidos no tumorales contribuyen también a incrementar los niveles de VEGF en el cuerpo. (Ferrara, 2004a; Kut *et al.*, 2007).

El objetivo del diagnóstico precoz del cáncer de pulmón es la detección de biomarcadores moleculares en muestras biológicas no invasivas antes de que los síntomas aparezcan. Múltiples factores como VEGF-A, VEGF-C, sVEGFR-2, FGF, endostatina, ICAM-1, CEA o CYFRA han sido investigados en sangre en diversos tumores como posibles

biomarcadores diagnósticos durante la última década (Aguayo *et al.*, 2002; Mysliwiec *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2002; Tamura and Ohta, 2003; Tamura *et al.*, 2002).

En relación a la utilidad diagnóstica de los marcadores angiogénicos, en este estudio hemos analizado los niveles plasmáticos de VEGF-A y sVEGFR-2 en pacientes con CPNM en estadios iniciales y en estadios avanzados, en comparación con individuos sanos. Los resultados de este análisis pusieron de manifiesto que los niveles de sVEGFR-2 se encontraban más elevados en pacientes con CPNM en estadios avanzados que en los casos controles ( $p < 0.0001$ ); no encontrándose, sin embargo, diferencias entre los niveles cuantificados en pacientes en estadios iniciales y controles (Tabla 12). Diferentes estudios han detectado el sVEGFR-2 en el plasma y suero de pacientes con cáncer (Al-Moundhri *et al.*, 2008; Dror *et al.*, 2009; Gora-Tybor *et al.*, 2005; Hanrahan *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2009; Kemik *et al.*, 2010; Mysliwiec *et al.*, 2009; Nikolinakos *et al.*, 2010; Tas *et al.*, 2006; Ustuner *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2012), sin embargo, pocos son los que han evaluado su utilidad como biomarcador diagnóstico. La mayoría de ellos han reportado resultados no significativos para diferenciar pacientes con cáncer de controles sanos (Al-Moundhri *et al.*, 2008; Kemik *et al.*, 2010; Mysliwiec *et al.*, 2009; Tas *et al.*, 2006). Mientras que Gora-Tybor y colaboradores sí que informaron de mayores niveles séricos de sVEGFR-2 en los pacientes en estadios avanzados con leucemia linfática crónica que en los pacientes en estadios iniciales o los casos controles (Gora-Tybor *et al.*, 2005) y Ustuner y colaboradores encontraron también mayores niveles de sVEGFR-2 en suero de pacientes con CMP que en controles (Ustuner *et al.*, 2008).

En cuanto a los niveles de VEGF-A, nuestros resultados mostraron que los pacientes con CPNM en estadios avanzados, así como los pacientes con CPNM en estadios iniciales, presentaban un incremento significativo de las concentraciones de sVEGF-A en comparación con los casos controles estudiados ( $p < 0.0001$  y  $p = 0.027$ , respectivamente) (Tabla 12). Cabe destacar, que los niveles de VEGF-A fueron superiores en pacientes en estadios avanzados que en pacientes en estadios iniciales, lo cual sugiere que los niveles de VEGF-A aumentan a medida que avanza la enfermedad. Estas observaciones estarían de acuerdo con informes previos en distintos tipos de cáncer y también en CPNM (Al-Moundhri *et al.*, 2008; Gora-Tybor *et al.*, 2005; Imoto *et al.*, 1998; Kaya *et al.*, 2004; Kemik *et al.*

*al.*, 2010; Laack *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2011; Takigawa *et al.*, 1998; Tamura and Ohta, 2003; Tamura *et al.*, 2001; Tas *et al.*, 2006; Trape *et al.*, 2003; Ustuner *et al.*, 2008).

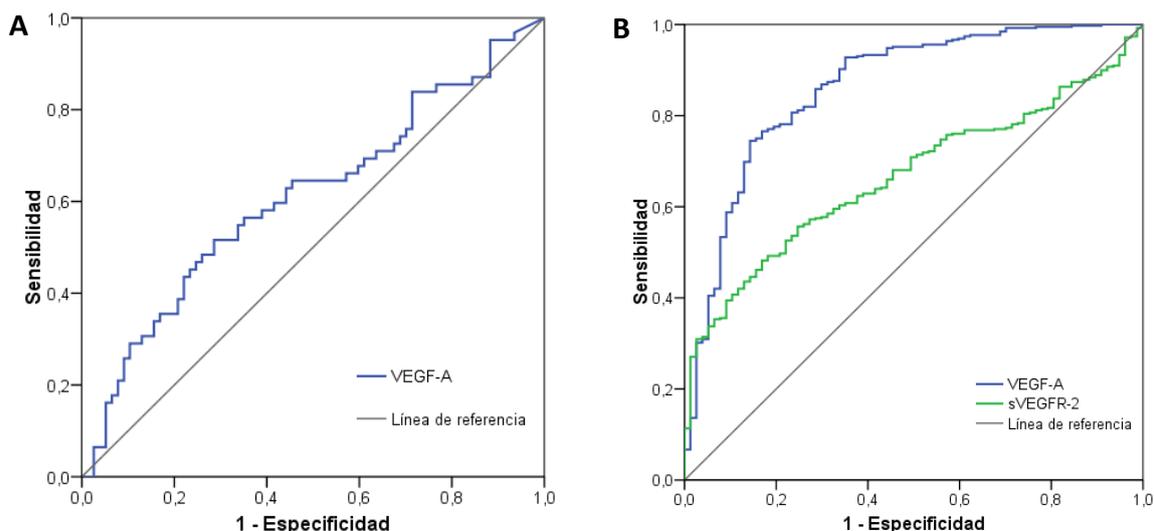
**Tabla 12.** Niveles plasmáticos de VEGF-A y sVEGFR-2 en pacientes con CPNM y controles sanos.

	VEGF-A (pg/ml)	sVEGFR-2 (pg/ml)
<b>Controles sanos</b>	<b>12.4</b> (0.5-314.7)	<b>6796</b> (3483-11283)
<b>CPNM estadios iniciales</b> (cohorte B)	<b>25.4</b> (0.5-211.8)	<b>6703</b> (3923-10751)
<b>CPNM estadios avanzados</b> (cohorte A)	<b>69.7</b> (0.8-664.7)	<b>8047</b> (2901-17761)
<sup>‡</sup> p controles vs. cohorte B	0.027*	0.880
<sup>‡</sup> p controles vs. cohorte A	<0.0001*	<0.0001*

<sup>‡</sup>Prueba de Mann-Whitney; \*p<0.05

Encontramos una correlación positiva entre los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2 ( $p=0.003$ ; coeficiente de correlación = 0.136) en los pacientes con estadios avanzados; mientras que la correlación no fue significativa ( $p=0.642$ ; coeficiente de correlación = 0.060) para los pacientes en estadios iniciales. Estas diferencias podrían deberse al menor número de pacientes analizados en estadios iniciales ( $n=62$ ) frente a estadios avanzados ( $n=432$ ), ya que otros estudios también han encontrado correlación positiva entre estos dos factores (Gora-Tybor *et al.*, 2005; Tas *et al.*, 2006; Ustuner *et al.*, 2008).

La evaluación de la precisión de VEGF-A y sVEGFR-2 circulantes en el diagnóstico del CPNM se realizó mediante las curvas ROC (Figura 10). Estas curvas representan la relación entre sensibilidad y especificidad de cada marcador. El indicador utilizado para evaluar la probabilidad de que el marcador sea capaz de distinguir correctamente entre los grupos de controles y pacientes es el Área bajo la curva ROC (AUC). Para la discriminación entre controles e individuos con CPNM en estadios iniciales, la curva ROC para VEGF-A presentó una AUC de 0.609 (95% IC, 0.513-0.705). Por otra parte, las AUC para discriminación entre controles e individuos con CPNM en estadios avanzados fueron 0.862 (95% IC, 0.814-0.911) para VEGF-A y 0.666 (95% IC, 0.612-0.720) para sVEGFR-2, encontrándose que las diferencias entre ambas curvas eran significativas ( $p<0.0001$ , prueba de  $\chi^2$ ) y siendo por tanto VEGF-A, el biomarcador más adecuado para discriminar entre los dos grupos.



**Figura 10.** Representación de las curvas ROC. (A) Curva ROC para la discriminación entre controles y pacientes con CPNM en estadios iniciales con VEGF-A; (B) Curvas ROC para la discriminación entre controles y pacientes con CPNM en estadios avanzados con VEGF-A y sVEGFR-2.

A partir de las coordenadas de las curvas ROC, se calculó el Índice de Youden (sensibilidad + especificidad) en cada caso y se escogió como valor de corte para el diagnóstico de CPNM el punto en el que la sensibilidad y la especificidad daban un valor máximo para cada marcador (Tabla 13).

**Tabla 13.** Puntos de corte con mayor sensibilidad y especificidad escogidos para la el diagnóstico de pacientes con CPNM.

	CPNM resecable		CPNM avanzado	
	VEGF-A		VEGF-A	sVEGFR-2
<b>Punto de corte</b> (pg/ml)	24.2		37.5	7718
<b>Sensibilidad</b> (%)	51.6		74.5	55.7
<b>Especificidad</b> (%)	71.4		85.7	75.3

Según nuestros datos, VEGF-A permite la discriminación entre individuos sanos y pacientes en estadios iniciales a partir de un valor de corte de 24.2 pg/ml, con una sensibilidad y especificidad de 51.6% y 71.4%, respectivamente. La discriminación entre pacientes en estadios avanzados y casos controles resultó ser más adecuada también con VEGF-A (valor de corte = 37.5 pg / ml, sensibilidad = 74.5% y especificidad = 85.7%) que con sVEGFR-2 (valor de corte = 7718 pg / ml, sensibilidad = 55.7% y especificidad = 75.3%) (Jantus-Lewintre *et al.*, 2011). Si bien, una posible limitación en la interpretación de VEGF-A como biomarcador diagnóstico, que debería ser

considerada en este estudio, es la falta de datos clínicos del grupo control (como la exposición profesional, el hábito tabáquico o la función pulmonar), que en algunos casos podrían sesgar los resultados.

Otros estudios que han evaluado la utilidad de VEGF-A como biomarcador diagnóstico en CPNM, sin embargo reportan diferencias en la sensibilidad y especificidad y en los valores de corte para la discriminación entre pacientes y controles (Chakra *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2011; Trape *et al.*, 2003). Las discrepancias de los trabajos previos en relación con el valor diagnóstico de los biomarcadores analizados, podrían deberse en parte a las diferencias en el número de casos estudiados, la heterogeneidad de algunas cohortes y sobre todo a las discordancias en la matriz utilizada para los análisis. En este sentido, existen importantes contradicciones entre los informes publicados en relación al método de recogida de muestras, el procesamiento, la manipulación de los datos y su interpretación y existe controversia en relación a qué matriz (suero, plasma o sangre total) puede proveer el mejor reflejo de la situación en el tumor (Hornbrey *et al.*, 2002; Jelkmann, 2001). Diversos estudios han demostrado que VEGF puede ser liberado en cantidades importantes de plaquetas y leucocitos durante la toma y posterior manipulación de la muestra sanguínea. Es por ello que los mayores niveles de VEGF encontrados en suero en comparación con el plasma se han atribuido a la liberación de VEGF de plaquetas y leucocitos en la coagulación. De acuerdo con esto, los niveles de VEGF en suero pueden reflejar el recuento de plaquetas en sangre en lugar de la producción de VEGF en los tejidos periféricos (Banks *et al.*, 1998; Verheul *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1998). Además, se ha demostrado que los niveles de VEGF y VEGFRs aumentan con la duración y temperatura de la coagulación y esto es difícil de estandarizar (Jelkmann, 2001; Webb *et al.*, 1998). Por tanto, ya que las muestras de suero no son representativas de las condiciones *in vivo* y es casi imposible llevar a cabo comparaciones entre laboratorios de los datos de VEGF en suero, debido principalmente a que los procedimientos de manipulación de la sangre no están normalizados con respecto a la coagulación, duración y temperatura, la recomendación general es usar plasma para un ensayo más preciso. Por todo ello, en el presente estudio, a diferencia de la mayoría de estudios previos, seleccionamos el plasma EDTA como la matriz más adecuada para el análisis de VEGF-A y sVEGFR-2.

Otro aspecto a tener en cuenta, es la sensibilidad del método de detección empleado para la cuantificación de los marcadores solubles. Recientemente se han incorporado como nuevos métodos de detección los ELISAS ultrasensibles, denominados como ensayos de segunda generación. Estos ensayos ultrasensibles detectan preferentemente las isoformas de VEGF-A cortas, las cuales son más bioactivas, en comparación con los ELISAS de primera generación, que presentan igual sensibilidad para las isoformas cortas y largas (Jayson *et al.*, 2011; Miles *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2011; Van Cutsem *et al.*, 2011). Esta mejora en la detección podría ser de gran importancia, ya que el aumento en la sensibilidad nos permitiría distinguir con mayor exactitud los valores en concentraciones bajas, un aspecto de crucial importancia para la discriminación entre controles sanos y pacientes en estadios iniciales, y por tanto para diagnosticar la enfermedad en una etapa precoz.

### **1.3. Correlación con las características clínico-patológicas**

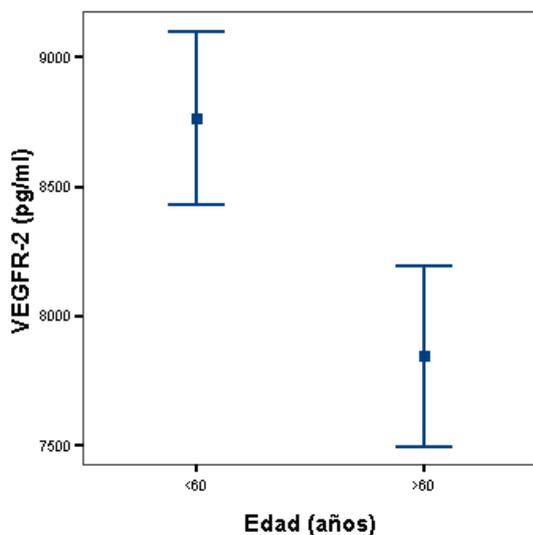
El análisis de la relación entre las características clínico-patológicas y los niveles plasmáticos de VEGF-A y sVEGFR-2 es necesario a la hora de establecer perfiles asociados a distintos comportamientos de la enfermedad. Dado que las variables no seguían una distribución normal, estos análisis se realizaron mediante pruebas no paramétricas (Prueba de *Mann-Whitney* o Prueba de *Kruskall-Wallis*) y con Tablas de Contingencia (estadístico  $\psi^2$ ).

#### **1.3.1. Cohorte A: pacientes con CPNM en estadios avanzados**

No se encontraron asociaciones significativas entre los niveles plasmáticos de VEGF-A y sVEGFR-2 y características clínicas tales como, ECOG-PS ( $p=0.312$  y  $p=0.177$ , respectivamente), sexo ( $p=0.106$  y  $p=0.519$ , respectivamente), estadio ( $p=0.115$  y  $p=0.108$ , respectivamente), histología ( $p=0.307$  y  $p=0.466$ , respectivamente), número de localizaciones metastásicas ( $p=0.079$  y  $p=0.681$ , respectivamente) y respuesta al tratamiento ( $p=0.655$  y  $p=0.079$ , respectivamente). En la evaluación de la respuesta, se encontraron 107 pacientes (24.8%) con respuestas clínicas, completa (RC) o parcial (PR) y 293 pacientes (67.8%) que presentaron enfermedad estable (EE) o en progresión (EP) (ver Tabla 10). Se observó que el conjunto de pacientes con EE o EP tenían

menores niveles de sVEGFR-2 que los pacientes con RC o RP, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas ( $p=0.079$ ).

En relación a la edad de los pacientes, se encontró que los pacientes mayores de 60 años tenían menores niveles de sVEGFR-2 ( $p<0.0001$ ) (Figura 11), mientras que no se encontraron diferencias entre los niveles de VEGFA y la edad ( $p=0.811$ ). La relación de sVEGFR-2 y la edad de los pacientes con CPNM no había sido descrita con anterioridad en la literatura.



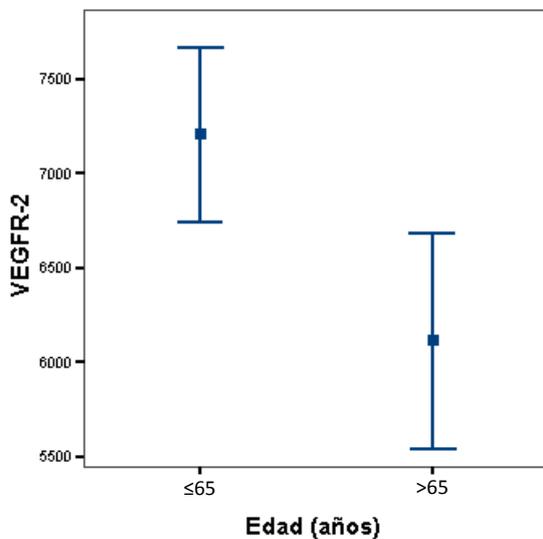
**Figura 11.** Relación de los niveles circulantes de sVEGFR-2 con la edad de los pacientes. Cohorte en estadios avanzados. Las barras de error representan media  $\pm$  95% IC.

### 1.3.2. Cohorte B: pacientes con CPNM en estadios iniciales

El análisis en función de las características clínico-patológicas reveló que no había relaciones significativas entre los niveles plasmáticos de VEGF-A y sVEGFR-2 con características clínicas tales como, ECOG-PS ( $p=0.226$  y  $p=0.972$ , respectivamente), sexo ( $p=0.617$  y  $p=0.898$ , respectivamente), estadio ( $p=0.838$  y  $p=0.145$ , respectivamente), histología ( $p=0.232$  y  $p=0.343$ , respectivamente), tamaño del tumor ( $p=0.479$  y  $p=0.231$ , respectivamente), afectación de nódulos linfáticos ( $p=0.226$  y  $p=0.093$ , respectivamente), grado de diferenciación ( $p=0.253$  y  $p=0.097$ , respectivamente) y hábito tabáquico ( $p=0.152$ ,  $p=0.525$ , respectivamente).

Por otra parte, se encontró una relación significativa entre la edad avanzada de los pacientes y los niveles plasmáticos de sVEGFR-2 más bajos ( $p=0.006$ ) (Figura 12); no encontrándose diferencias para VEGF-A y la edad ( $p=0.264$ ). Por tanto, en concordancia con lo descrito en el subapartado anterior, esta relación inversa

existente entre la edad y los niveles de sVEGFR-2 se presenta en pacientes con CPNM en estadios avanzados y también en los estadios iniciales.



**Figura 12.** Relación de los niveles circulantes de sVEGFR-2 con la edad de los pacientes. Cohorte en estadios iniciales. Las barras de error representan media  $\pm$  95% IC.

#### 1.4. Análisis del valor pronóstico de los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2

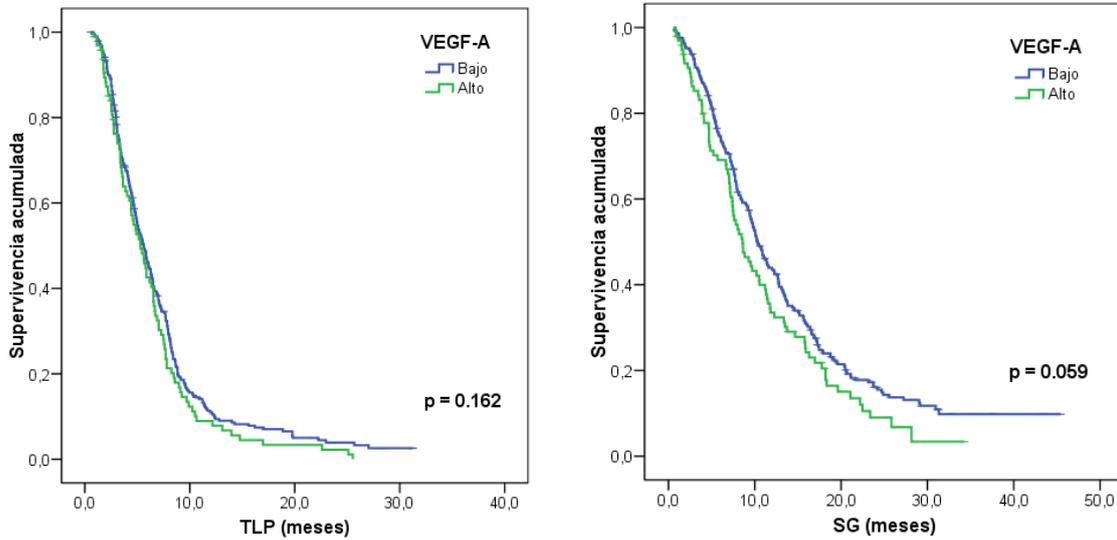
##### 1.4.1. Cohorte A: pacientes con CPNM en estadios avanzados

En la cohorte de pacientes con CPNM en estadios avanzados la mediana de seguimiento fue de 9.7 meses (0.5-45.4). De los 432 pacientes incluidos, 393 (91%) progresaron y 356 (82.4%) fallecieron. Las medianas de TLP y SG para la población total fueron de 5.6 meses y 10 meses, respectivamente.

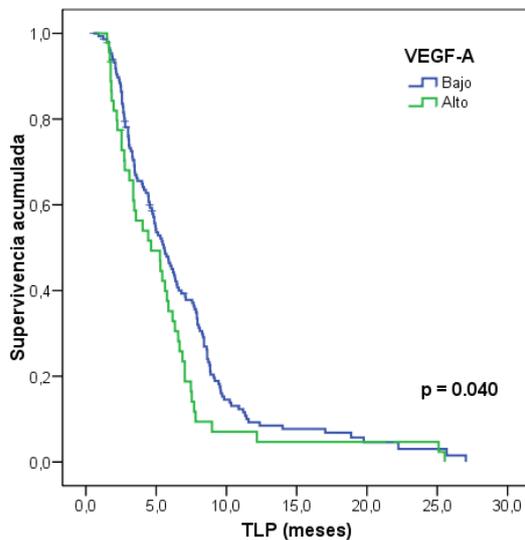
El análisis de la influencia de los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2 en el TLP y la SG se realizó mediante el método *Kaplan-Meier* empleando el estadístico log-rango. Para ello, las variables continuas se dicotomizaron en grupos de niveles altos y bajos, utilizando como valor de corte el percentil 75, siendo para VEGF-A de 140.7 pg/ml y para sVEGFR-2 de 9936 pg/ml.

Los análisis de supervivencia revelaron que no existía una asociación significativa entre el TLP y la SG con los niveles de VEGF-A, aunque se observó una tendencia a un TLP ( $p=0.162$ ) y una SG ( $p=0.059$ ) más cortos con niveles altos de VEGF-A pre-tratamiento (Figura 13, Tabla 14). Cuando se realizaron análisis de supervivencia por subgrupos de pacientes, se encontró además que el subgrupo de histología

adenocarcinoma presentaban diferencias significativas en TLP ( $p=0.040$ ) (Figura 14) (Jantus-Lewintre *et al.*, 2011).



**Figura 13.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para los niveles plasmáticos de VEGF-A. Cohorte de estadios avanzados. La línea azul representa los casos con niveles de VEGF-A bajos, mientras que la línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A altos.

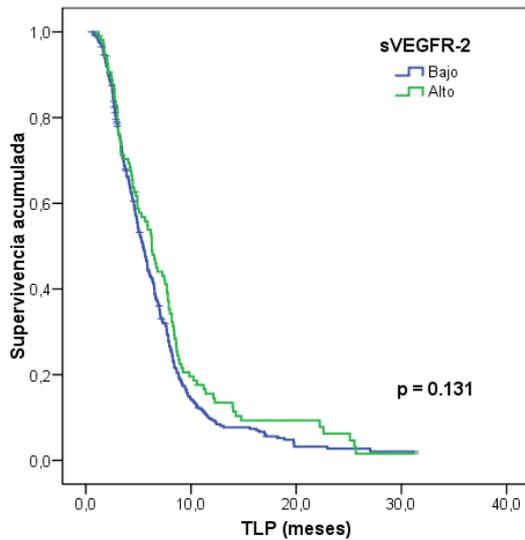


**Figura 14.** Gráfico de *Kaplan-Meier* de TLP para los niveles plasmáticos de VEGF-A en pacientes con histología adenocarcinoma. La línea azul representa los casos con niveles de VEGF-A bajos, mientras que la línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A altos.

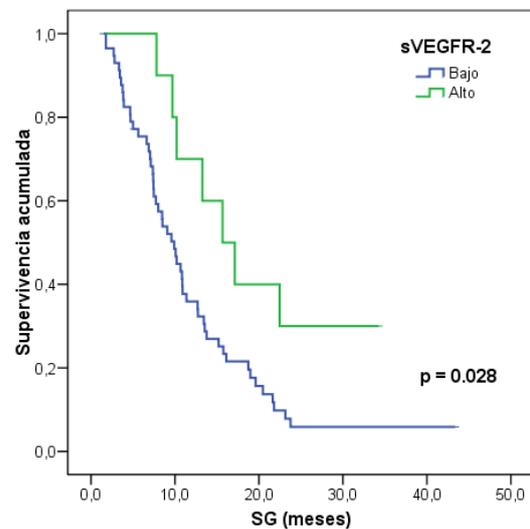
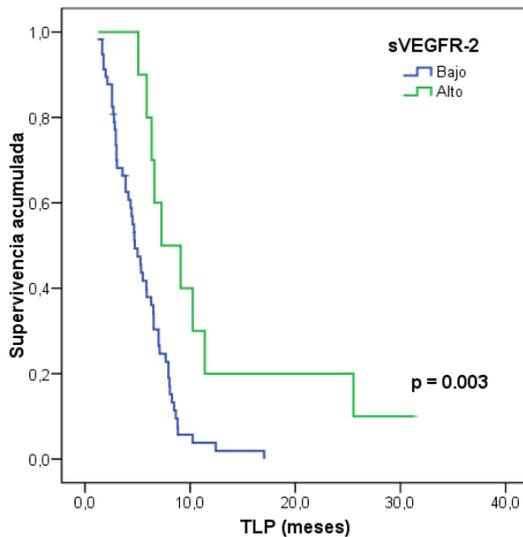
Un número considerable de trabajos han estudiado en los últimos años la relación de VEGF-A con el pronóstico en CPM (revisado por Bremnes) (Bremnes *et al.*, 2006). Algunos estudios reportan evidencias de que existe una correlación entre los niveles de VEGF-A y la evolución de la enfermedad, así como una asociación inversa con el pronóstico (Brattstrom *et al.*, 2002; Brattstrom *et al.*, 2004; Kaya *et al.*, 2004; Laack *et al.*, 2002). En cuanto al valor predictivo de respuesta, los niveles basales bajos de

VEGF-A circulante se asociaron con un mejor pronóstico en supervivencia libre de progresión en pacientes con CPNM tratados con terapias anti-angiogénicas (Hanrahan *et al.*, 2009). Sin embargo, otros estudios no han aportado pruebas concluyentes acerca de la fiabilidad de estas correlaciones al no encontrar diferencias significativas (Chakra *et al.*, 2008;Choi *et al.*, 2001;Park and Lee, 2003;Suzuki *et al.*, 2002;Trape *et al.*, 2003). Los contradictorios resultados de los trabajos previos en relación con el valor pronóstico o predictivo de los biomarcadores analizados, pueden ser explicados en parte por el pequeño tamaño de algunas cohortes, la heterogeneidad de las poblaciones de pacientes y las discrepancias en la selección de la matriz utilizada para la evaluación de los biomarcadores circulantes.

En el caso de sVEGFR-2, los análisis de supervivencia mostraron que había una tendencia a menores TLP en los pacientes con niveles más bajos ( $p=0.131$ ) (Figura 15, Tabla 14). Además los análisis restringidos al subgrupo de pacientes en estadio III, mostraron diferencias significativas en TLP ( $p=0.003$ ) y SG ( $p=0.028$ ) (Figura 16) (Jantus-Lewintre *et al.*, 2011). Estas observaciones podrían explicarse, tal y como apoyan diversos estudios, por el papel que podría desempeñar sVEGFR-2 como un potente inhibidor selectivo de la angiogénesis mediada por VEGF (Kou *et al.*, 2004;Kuhnert *et al.*, 2008). Según esto, cuando sVEGFR-2 se presenta en niveles elevados, podría captar VEGF-A, de manera que quedaría menos VEGF-A libre para unirse a su receptor en la membrana de las células endoteliales. Contrariamente, si sVEGFR-2 está en niveles bajos, quedaría más VEGF-A libre en circulación para ejercer su efecto angiogénico. Por otro lado, otros estudios indican que sVEGFR-2 también puede actuar como un estimulador de la maduración de los vasos a través del reclutamiento de células murales (Lorquet *et al.*, 2010) y como un inhibidor selectivo endógeno del crecimiento de los vasos linfáticos (Albuquerque *et al.*, 2009).

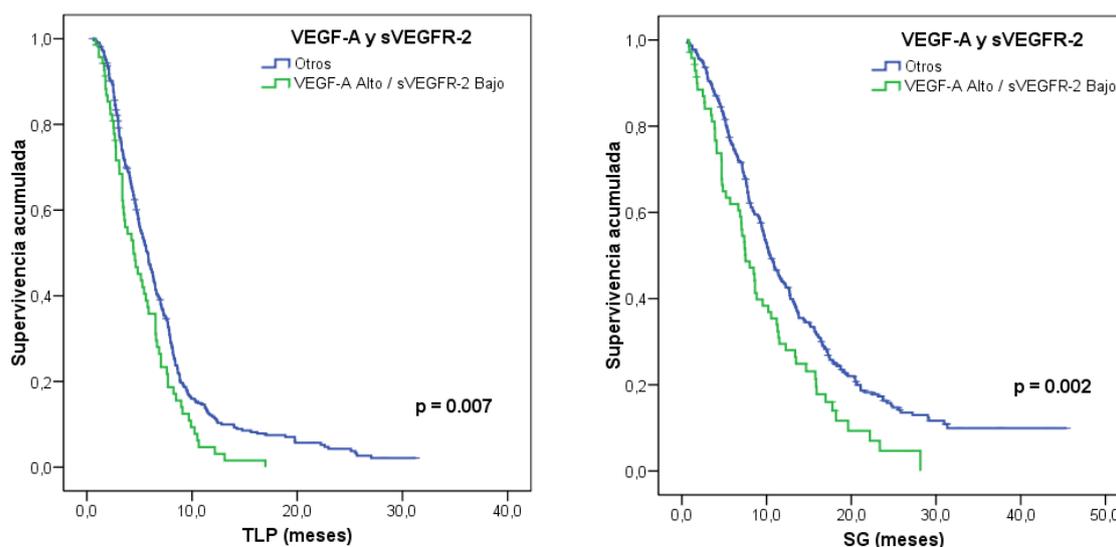


**Figura 15.** Gráfico de *Kaplan-Meier* de TLP para los niveles plasmáticos de sVEGFR-2. Cohorte de estadios avanzados. La línea azul representa los casos con niveles de sVEGFR-2 bajos, mientras que la línea verde representa los casos con niveles de sVEGFR-2 altos.



**Figura 16.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para los niveles plasmáticos de sVEGFR-2 en el grupo de pacientes en estadio III. La línea azul representa los casos con niveles de sVEGFR-2 bajos, mientras que la línea verde representa los casos con niveles de sVEGFR-2 altos.

En vista de estos resultados observados, decidimos abordar la combinación de los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2. De este modo, encontramos que los pacientes que pertenecían al subgrupo caracterizado por la combinación de niveles elevados de VEGF-A (> percentil 75) con niveles bajos de sVEGFR-2 (< percentil 75) presentaban un peor pronóstico en TLP (4.4 meses vs. 5.8 meses, respectivamente;  $p=0.007$ ) y SG (7.5 meses vs. 10.4 meses, respectivamente;  $p=0.002$ ) al comparar con las otras posibles combinaciones de estos dos mediadores angiogénicos (Figura 17, Tabla 14) (Jantus-Lewintre *et al.*, 2011).



**Figura 17.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la combinación de niveles plasmáticos de VEGF-A y de sVEGFR-2. Cohorte de estadios avanzados. La línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A altos y sVEGFR-2 bajos, mientras que la línea azul representa el resto de los casos.

**Tabla 14.** Análisis de supervivencia de variables clínico-patológicas y marcadores angiogénicos. Cohorte en estadios avanzados. Análisis univariante por método de *Kaplan-Meier* (estadístico log-rango).

VARIABLES	TLP		SG	
	Mediana de progresión (meses)	<i>p</i>	Mediana de supervivencia (meses)	<i>p</i>
<b>Edad (años)</b>				
≤60	5.3	0.117	9.6	0.363
>60	5.9		10.8	
<b>Sexo</b>				
Hombre	6.7	0.009*	9.6	0.018*
Mujer	5.3		13.5	
<b>ECOG-PS</b>				
0	6.6	0.016*	13.1	0.001*
1/2	5.3		9.2	
<b>Histología</b>				
Epidermoide	5.6	0.358	10.9	0.563
Adenocarcinoma	5.6		9.9	
Otros	5.8		9.2	
<b>Estadio</b>				
IIIB	5.5	0.333	10.2	0.912
IV	5.6		9.9	
<b>VEGF-A</b>				
Bajo	5.6	0.162	10.3	0.059
Alto	5.3		8.6	
<b>sVEGFR-2</b>				
Bajo	5.4	0.131	9.8	0.218
Alto	6.3		10.9	
<b>VEGF-A/sVEGFR-2</b>				
↑VEGF-A/↓sVEGFR-2	4.4	0.007**	7.5	0.002**
Otros	5.8		10.4	

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.05$ ; TLP, tiempo libre de progresión; SG, supervivencia global; ↑, Alta expresión; ↓, Baja expresión

Finalmente se realizó el análisis multivariante según el modelo de regresión de *Cox*, que revela cuáles de las variables analizadas son de pronóstico independiente. Para ello, previamente, se analizaron también todas las variables clínico-patológicas que pudieran estar relacionadas con el desarrollo de la enfermedad mediante el método de *Kaplan-Meier* o el análisis univariante de *Cox*. En el análisis de *Cox* se incluyeron todas las variables que fueron significativas en para el análisis univariante (ver Tabla 14): sexo, ECOG-PS y la variable combinada de VEGF-A y sVEGFR-2. El análisis reveló que para el TLP, las variables de pronóstico independiente en esta población eran la variable combinada de VEGF-A y sVEGFR-2 y el sexo. En cuanto a la SG, los marcadores de pronóstico independiente resultaron ser la combinación de VEGF-A y sVEGFR-2, el ECOG-PS y el sexo (Tabla 15).

**Tabla 15.** Análisis multivariante de Cox para TLP y SG. Cohorte en estadios avanzados.

VARIABLES	TLP			SG		
	HR	95% IC	p	HR	95% IC	p
<b>ECOG-PS</b>						
0				1.00		
1/2	---	---	0.135	1.44	1.11-1.87	0.006*
<b>Sexo</b>						
Mujer	1.00			1.00		
Hombre	1.43	1.07-1.90	0.014*	1.45	1.07-1.98	0.017*
<b>VEGF-A/sVEGFR-2</b>						
Otros	1.00			1.00		
↑VEGF-A/↓sVEGFR-2	1.44	1.09-1.88	0.009**	1.49	1.12-1.97	0.006**

\*p<0.05; \*\*p<0.05; TLP, tiempo libre de progresión; SG, supervivencia global; ↑, Alta expresión; ↓, Baja expresión; HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza.

La comparación de las características clínico-patológicas del subgrupo de pacientes de mal pronóstico (altos niveles de VEGF-A y bajos niveles de sVEGFR-2 en plasma) con el grupo de pacientes de buen pronóstico (otras posibles combinaciones de ambas variables) mostró que no había diferencias significativas en el rango de edad ni en las frecuencias de los tipos histológicos, estadios, ECOG-PS, sexo y respuesta al tratamiento de ambos subgrupos, sugiriendo que las diferencias encontradas en TLP y SG se debían a los diferentes niveles de VEGF-A y sVEGFR-2 (Tabla 16).

**Tabla 16.** Características de los pacientes en función de los niveles solubles de VEGF-A y sVEGFR-2.

Características de los pacientes	Alto VEGF-A y bajo sVEGFR-2		Otros		p <sup>a</sup>
	No.	%	No.	%	
<b>Total</b>	71	100	317	100	
<b>Edad</b>					
Mediana	59.9		59.7		
Rango	33.9-78		30.7-79.2		0.93
<b>Sexo</b>					
Hombre	62	87.3	261	82.3	
Mujer	9	12.7	56	17.7	0.38
<b>Histology</b>					
Adenocarcinoma	34	47.9	161	50.8	
Epidermoide	23	32.4	101	31.9	
Células grandes	12	16.9	45	14.2	
Otros	2	2.8	10	3.2	0.94
<b>Estadio</b>					
IIIB	14	19.7	49	15.5	
IV	57	80.3	268	84.5	0.38
<b>ECOG-PS</b>					
0	12	16.9	84	26.5	
1	58	81.7	230	72.6	
2	0	0	2	0.6	
No disponible	1	1.4	1	0.3	0.19
<b>Respuesta</b>					
Respuesta completa	0	0	3	1	
Respuesta parcial	14	19.7	77	24.3	
Enfermedad estable	18	25.3	110	34.7	
Progresión de enfermedad	31	43.7	105	33.1	
No disponible	8	11.3	22	6.9	0.20

<sup>a</sup>p calculada mediante la prueba de Mann Whitney en el caso de la edad y mediante la prueba de  $\chi^2$  en el caso de las otras variables no continuas.

Por tanto, el elevado número de pacientes incluidos en esta cohorte (432) centrada solo en los estadios avanzados, nos permitió estudiar mayor número de casos que la mayoría de estudios previos. En el análisis del valor pronóstico de VEGF-A y sVEGFR-2 no se observaron diferencias significativas, aunque sí encontramos claras tendencias a menores TLP y SG en los pacientes del grupo con altos niveles plasmáticos de VEGF-A, así como, la misma tendencia en TLP para los pacientes del grupo de niveles bajos de sVEGFR-2. Interesantemente, se encontraron mayores asociaciones entre el pronóstico

y los niveles de estos factores angiogénicos cuando se analizaron grupos de pacientes más homogéneos, como el grupo de adenocarcinomas con VEGF-A y el grupo de estadios III con sVEGFR-2. Así pues, parece que los marcadores individualmente podrían ser más útiles y significativos para ciertas histologías o ciertos estadios tumorales como se muestra en este estudio. Sin embargo, cuando los marcadores son considerados en combinación proporcionan un perfil o modelo más completo, mejorando significativamente su valor pronóstico. Esto se ha observado previamente en otros tipos de cáncer como en hepatocarcinomas (usando sVEGFR-1 y PIGF) (Nagaoka *et al.*, 2010) y en cáncer de páncreas (usando sVEGFR-1 y VEGF) (Chang *et al.*, 2008). De acuerdo con nuestros datos, hemos identificado un subgrupo de pacientes con CPNM que presentan un perfil más angiogénico (definido por la combinación de alto VEGF-A y bajo sVEGFR-2) y que parece exhibir un comportamiento más agresivo de la enfermedad. Esta variable combinada además ha resultado ser un factor de pronóstico independiente para TLP y SG en el análisis multivariado (Jantus-Lewintre *et al.*, 2011).

#### **1.4.2. Cohorte B: pacientes con CPNM en estadios iniciales**

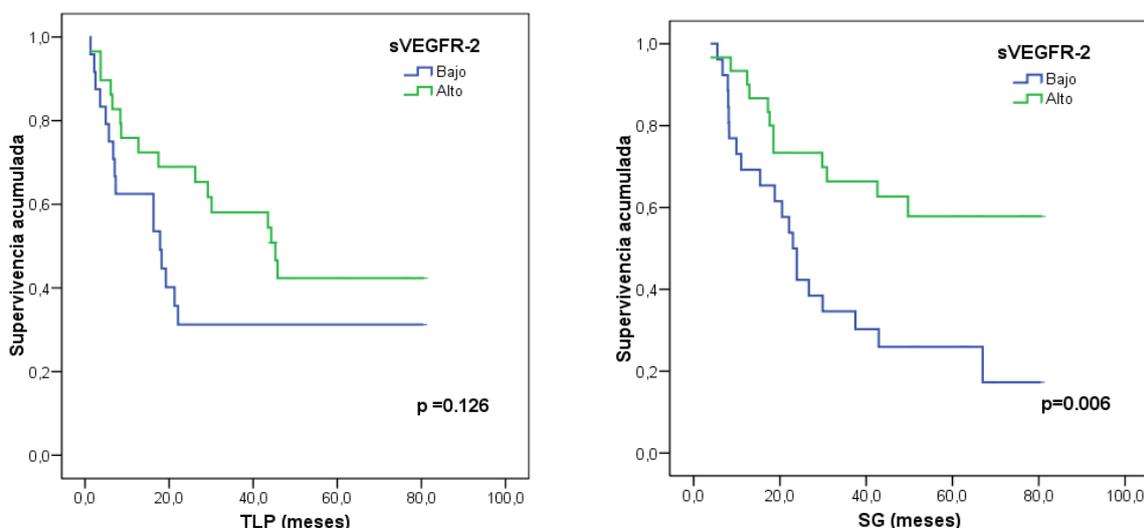
En la cohorte de pacientes con CPNM en estadios iniciales la mediana de seguimiento fue de 32 meses (3.9-80.6), 37 pacientes (59.7%) progresaron y 34 de los 62 pacientes analizados (54.8%) fallecieron. Las medianas de TLP y SG para la población fueron de 29.2 meses y 37.5 meses, respectivamente.

El análisis de la influencia de los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2 en el TLP y la SG se realizó mediante el método *Kaplan-Meier* empleando el estadístico log-rango. Para ello, las variables continuas se dicotomizaron en grupos de niveles altos y bajos, utilizando como valor de corte la mediana de cada marcador (25.39 pg/ml para VEGF-A y 6703 pg/ml para sVEGFR-2).

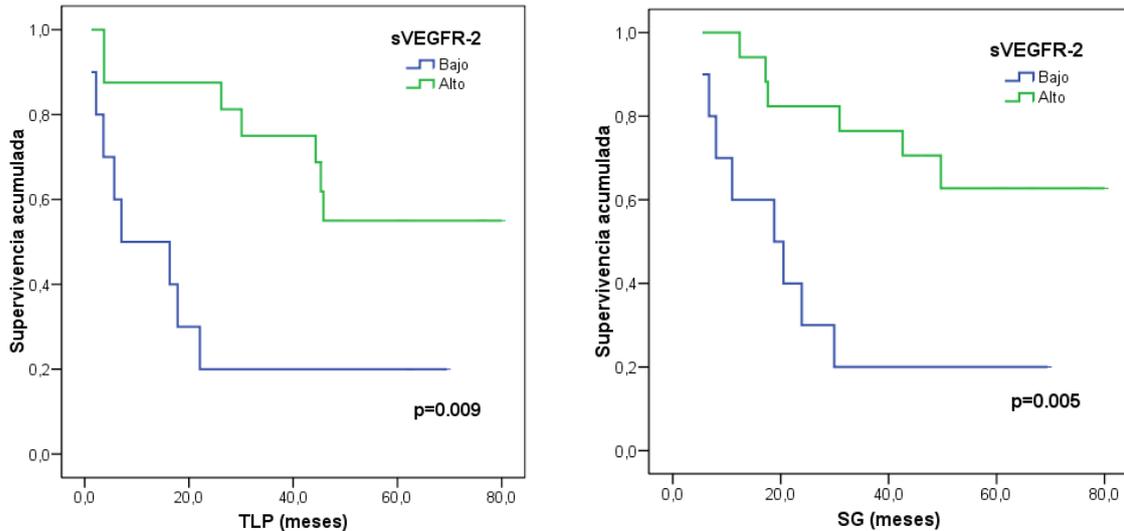
En este caso, los análisis de supervivencia no mostraron ninguna asociación significativa entre TLP y SG con los niveles de VEGF-A circulante (Tabla 17). Tampoco los análisis limitados a subgrupos por estadio o histología mostraron ninguna asociación con el pronóstico. Esta diferencia con los análisis del subapartado anterior puede deberse a que en los pacientes en estadios iniciales la carga tumoral es menor, y por consiguiente,

presentan menores niveles circulantes de los marcadores que los pacientes en enfermedad avanzada, como demuestran los menores niveles de VEGF-A detectados en plasma. Así pues, el empleo de métodos ultrasensibles, como los ELISAS de segunda generación, podría mejorar la sensibilidad de detección en los rangos de concentraciones más bajas, en los que se encuentran los pacientes en estadios iniciales. También deberíamos considerar que en los estadios tempranos de CPNM pudiera haber otros factores, independientemente de la angiogénesis, que intervinieran en mayor medida en el pronóstico de los pacientes. Otro factor importante a tener en cuenta, es el menor número de casos de esta cohorte de pacientes, lo que podría afectar a que no se encuentren diferencias.

Por otro lado para sVEGFR-2, los análisis de supervivencia revelaron que los pacientes con niveles bajos de este marcador en circulación presentaban un menor TLP ( $p=0.126$ ) y una menor SG ( $p=0.006$ ) (Figura 18, Tabla 17). Además, cuando se realizaron los análisis de supervivencia por subgrupos de pacientes, se encontró que el subgrupo de histología epidermoide presentaba diferencias más significativas en TLP ( $p=0.009$ ) y SG ( $p=0.005$ ) (Figura 19). Esta asociación de sVEGFR-2 con el pronóstico está en concordancia con la descrita en el subapartado anterior para los pacientes en estadios avanzados, y de nuevo vendría a reforzar la hipótesis de que sVEGFR-2 podría actuar en circulación captando VEGF-A, de modo que se comportaría como un inhibidor selectivo de la angiogénesis mediada por VEGF-A (Kou *et al.*, 2004; Kuhnert *et al.*, 2008).



**Figura 18.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para sVEGFR-2. Cohorte de estadios iniciales. La línea azul representa los casos con niveles de bajos de sVEGFR-2, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de sVEGFR-2.



**Figura 19.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para sVEGFR-2 en pacientes con histología epidermoide. Cohorte de estadios iniciales. La línea azul representa los casos con niveles de bajos de sVEGFR-2, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de sVEGFR-2.

A continuación se realizó también el análisis para la combinación de los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2. El análisis mostró que los pacientes que pertenecían al subgrupo caracterizado por la combinación de niveles elevados de VEGF-A ( $\geq$  mediana) con niveles bajos de sVEGFR-2 ( $<$  mediana) presentaban una tendencia a un peor pronóstico en TLP y SG, pero en este caso, las diferencias no fueron significativas ( $p=0.488$  y  $p=0.150$ , respectivamente) (Tabla 17). A diferencia de los resultados obtenidos en la otra cohorte de estadios avanzados, en este caso no pudimos demostrar la asociación de esta variable con el pronóstico de los pacientes ya que las diferencias no alcanzaron la significación estadística. Sin embargo, cabe remarcar, que la tendencia observada en este análisis era la misma, pues los pacientes que combinaban niveles más elevados de VEGF-A y niveles más bajos de sVEGFR-2 fueron los que mostraron un pronóstico en TLP y SG más desfavorable.

En el análisis univariante por el método de *Kaplan-Meier* para las variables clínico-patológicas, ninguna de las variables resultó ser significativa (Tabla 17).

**Tabla 17.** Análisis de supervivencia de variables clínico-patológicas y marcadores angiogénicos. Cohorte en estadios iniciales. Análisis univariante (*Kaplan-Meier*, estadístico Log-rango).

VARIABLES	TLP		SG	
	Mediana de progresión (meses)	<i>p</i>	Mediana de supervivencia (meses)	<i>p</i>
<b>Edad (años)</b>				
≤65	44.3	0.157	49.7	0.220
>65	18.2		26.7	
<b>Sexo</b>				
Hombre	26.2	0.284	29.9	0.296
Mujer	NA		NA	
<b>ECOG-PS</b>				
0	44.3	0.150	49.7	0.086
1/2	17.5		23.9	
<b>Histología</b>				
Epidermoide	44.3	0.239	49.7	0.486
Adenocarcinoma	29.2		37.5	
Otros	8.6		18.5	
<b>Estadio</b>				
I	29.2	0.837	29.9	0.998
II	21.3		42.9	
IIIA	7.3		17.2	
<b>Tamaño tumoral <sup>a</sup></b>				
≤3.5 cm	40.5	0.303	43.6	0.574
>3.5 cm	19.2		37.5	
<b>Afectación de nódulos linfáticos</b>				
No	43.5	0.447	49.7	0.355
Sí	16.3		29.8	
<b>Grado de diferenciación</b>				
Bien diferenciado	NA	0.591	NA	0.347
Moderado	26.2		37.5	
Poco diferenciado	17.8		49.7	
<b>EGFR</b>				
Nativo	18.2	0.595	23.9	0.438
Mutado	16.3		42.9	
<b>Tabaquismo</b>				
No fumador	NA	0.239	NA	0.340
Exfumador	20		23	
Fumador activo	28		40	
<b>VEGF-A</b>				
Bajo	22.1	0.722	29.9	0.545
Alto	42.6		44.3	
<b>sVEGFR-2</b>				
Bajo	17.8	0.126	23	0.006
Alto	45.3		NA	*
<b>VEGF-A/sVEGFR-2</b>				
Otros	30.1	0.488	49.7	0.150
↑VEGF-A/↓sVEGFR-2	19.2		22.1	

<sup>a</sup>Tamaño tumoral dicotomizado según la mediana; \**p*<0.05; TLP, tiempo libre de progresión; SG, supervivencia global; ↑, Alta expresión; ↓, Baja expresión; NA: No alcanzada.

Por último, se realizó el análisis multivariante según el modelo de regresión de *Cox*, en el cual se incluyeron la variable sVEGFR-2 y también ECOG-PS, ya que aunque en este último caso no fue significativa, mostró una clara tendencia ( $p=0.150$  para el TLP y  $p=0.086$  para la SG) y podría tener influencia en el pronóstico de los pacientes. En el análisis de *Cox*, sVEGFR-2 se reveló como marcador de pronóstico independiente para la SG ( $p= 0.008$ ) con un HR de 2.64 para el grupo de niveles bajos frente al de niveles altos. En el análisis de *Cox* para el TLP, ninguna de las dos variables resultó ser de pronóstico independiente.

En resumen, los resultados del estudio del valor pronóstico de VEGF-A y sVEGFR-2 en la cohorte de pacientes en estadios iniciales mostraron menores diferencias en términos de significación estadística que los análisis realizados para la cohorte en estadios avanzados. El análisis de supervivencia para VEGF-A no aportó pruebas concluyentes para la correlación con el TLP o SG de los pacientes, tal y como sucedía en diversos estudios previos (Chakra *et al.*, 2008;Choi *et al.*, 2001;Park and Lee, 2003;Suzuki *et al.*, 2002;Trape *et al.*, 2003). En este caso fue sVEGFR-2 la única variable que mostró asociación con el pronóstico, resultado ser además una variable de pronóstico independiente para la SG según el análisis de *Cox*. Además, la combinación de VEGF-A y sVEGFR-2 no mejoró el valor pronóstico para los pacientes con CPNM resecable. Por tanto, los resultados obtenidos de este estudio parecen indicar que los factores angiogénicos circulantes son modestos indicadores pronósticos de la agresividad tumoral y la supervivencia cuando se trata de pacientes con CPNM en estadios iniciales, mientras que tienen un elevado valor pronóstico cuando se trata de pacientes con enfermedad avanzada. Así pues, serían necesarios futuros estudios prospectivos utilizando mayor número de pacientes para establecer la utilidad de los análisis de VEGF-A y sVEGFR-2 en sangre periférica como factores pronósticos en CPNM resecable y demostrar su posible utilidad clínica.

## 2. Capítulo II. Marcadores tisulares

### 2.1. Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de la población

En este estudio se han incluido 175 pacientes con CPNM en estadios iniciales, que fueron sometidos a resección quirúrgica en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV). Las características clínico-patológicas más relevantes de esta cohorte de pacientes se detallan en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes. Cohorte en estadios iniciales.

	N	%
<b>Total</b>	175	100
<b>Edad (años)</b>		
Mediana	63	
Rango	26-85	
<b>Sexo</b>		
Hombre	152	86.9
Mujer	23	13.1
<b>Histología</b>		
Adenocarcinoma	69	39.4
Epidermoide	83	47.5
Células grandes	6	3.4
Otros	17	9.7
<b>Estadio</b>		
I	92	52.6
II	45	25.7
IIIA	38	21.7
<b>ECOG-PS</b>		
0	126	72
1	47	26.9
2	2	1.1
<b>EGFR</b>		
Nativo	58	33.1
Mutado	10	5.7
No disponible	107	61.2
<b>Tabaquismo</b>		
No fumador	20	11.4
Exfumador	71	40.6
Fumador activo	84	48
<b>Tratamiento postoperatorio</b>		
No	115	65.7
Quimioterapia	38	21.7
Quimioterapia/Radioterapia	22	12.6

La edad mediana de los pacientes fue de 63 años, el 86.9% eran varones y el subtipo histológico predominante fue el epidermoide (47.5%). El 52.6% de los pacientes estaban en estadio I, la mayoría presentaban un PS=0 y solamente un 11.4% eran no fumadores. Con respecto al tratamiento postoperatorio, un 65.7% no recibieron ningún tratamiento adyuvante, un 21.7% recibió quimioterapia postoperatoria (dobletes de platino sin ninguna terapia biológica adicional) y un 12.6% recibieron una combinación de quimio/radioterapia.

## 2.2. Análisis del estado mutacional del gen *EGFR* en muestras tumorales

De las 68 muestras de tumores disponibles para el análisis del estado mutacional de *EGFR*, un total de 58 muestras (85.3%) presentaban la forma nativa del gen *EGFR*, mientras que 10 muestras (14.7%) presentaban alguna mutación para dicho gen. La frecuencia de pacientes con la mutación coincide con la literatura. Además, las mutaciones de *EGFR* fueron más frecuentes en mujeres (70%), histología adenocarcinoma (90%) y no fumadores (60%) tal y como se muestra en la Tabla 19. Estos porcentajes son similares a los reportados previamente por diversos estudios, incluidos estudios multicéntricos (Li *et al.*, 2008; Molina-Vila *et al.*, 2008; Rosell *et al.*, 2012; Rosell *et al.*, 2009). La Tabla 20 muestra los porcentajes de las diferentes mutaciones encontradas en la población estudiada.

**Tabla 19.** Frecuencia de las mutaciones de *EGFR* en función de las características clínico-patológicas de los pacientes.

Variable	Pacientes analizados (n)	Pacientes con mutación (n)	Frecuencia de las mutaciones (%)	
			por categoría	sobre el total de mutados
<b>Total</b>	68	10		
<b>Edad (años)</b>				
≤65	39	5	12.8	50
>65	29	5	17.2	50
<b>Sexo</b>				
Hombre	54	3	5.6	30
Mujer	14	7	50	70
<b>Histología</b>				
Adenocarcinoma	46	9	19.6	90
Epidermoide	6	0	-	-
Células grandes	3	0	-	-
Otros	13	1	7.7	10
<b>Tabaquismo</b>				
No fumador	14	6	42.9	60
Exfumador	24	2	8.3	20
Fumador activo	30	2	6.7	20

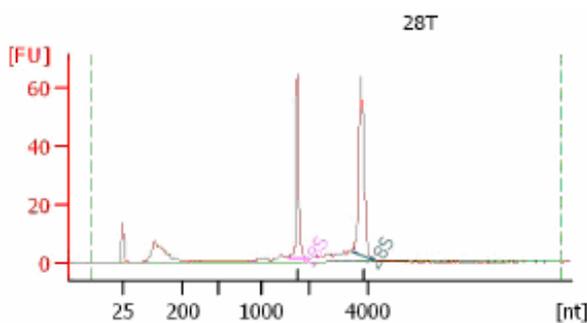
**Tabla 20.** Frecuencia de las diferentes mutaciones de *EGFR* detectadas.

Tipo de mutación	Pacientes (n)	%
Del 19	1	10
Ex 20	3	30
Ex21	6	60

### 2.3. Cuantificación y valoración de la calidad del ARN

En este proyecto se analizaron 175 muestras de tejido sano y tumoral de las cuales se tomó una pequeña pieza de aproximadamente 10-20 mg para realizar las extracciones de ARN. En todas las muestras se obtuvo una concentración óptima de ARN para los posteriores estudios de expresión, siendo el promedio de ARN extraído de 54,7  $\mu$ g.

Con respecto a la valoración de la calidad de las muestras se tuvieron en cuenta dos aspectos: la pureza y la integridad de las muestras. El grado de pureza del ARN, determinado en función de los ratios calculados con las absorbancias a 260/280 y 260/230 mediante nanoespectrofotometría, resultó ser óptimo en todas las muestras, con valores comprendidos entre 1.7 y 2.0. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis capilar. En todos los casos las muestras presentaron una buena integridad, ya que los picos representativos del ARN 18S y 28S estaban presentes en todas las muestras y el RIN (*RNA Integrity Number*) fue superior a 7 (Figura 20).



**Overall Results for sample 8 :** **28T**  
 RNA Area: 245.0  
 RNA Concentration: 131 ng/ $\mu$ l  
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4  
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02,07)  
 Result Flagging Color:   
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

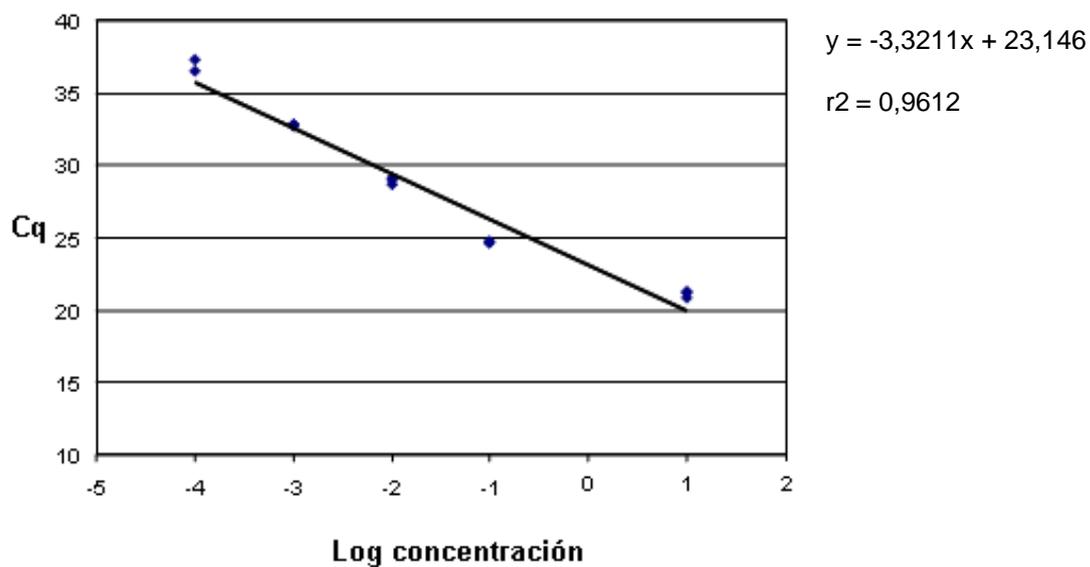
**Fragment table for sample 8 :** **28T**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,581	2,025	52.1	21.3
28S	3,442	4,231	73.1	29.8

**Figura 20.** Ejemplo de un electroferograma para una muestra de tejido tumoral obtenido mediante electroforesis capilar. El electroferograma muestra los dos picos correspondientes a las bandas del ARN ribosómico de 18S y 28S bien definidos y de la misma altura. También mide la concentración de la muestra, integrando las áreas bajo los picos y evalúa la integridad mediante el número RIN.

## 2.4. Cálculo de las eficiencias de la amplificación y linealidad

Para realizar el cálculo de las eficiencias de la amplificación se utilizó un ADNc de referencia (*qPCR Human Referente cDNA random-primed, Clontech, EEUU*) a partir del cual se realizaron diluciones seriadas (50 ng/μl, 5 ng/μl, 0.5 ng/μl, 0.05 ng/μl y 0.005 ng/μl) y se cuantificaron los niveles de expresión de los genes diana mediante RTqPCR para cada dilución por triplicado. En la Figura 21 se representa la curva de diluciones estándar para realizar el cálculo de la eficiencia de amplificación.



**Figura 21.** Representación de la curva estándar para el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen VEGFR-2. Para el cálculo de la eficiencia se deben representar los valores de Cq de cada dilución, en función del logaritmo de la concentración (absoluta o relativa).

A partir de la pendiente de la recta obtenida para cada gen, se calculó la eficiencia aplicando la siguiente ecuación:  $E = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$ . La Tabla 21 muestra los resultados del cálculo de la eficiencia para los genes estudiados. Como se puede observar, en todos los casos las eficiencias eran muy cercanas al 100%.

**Tabla 21.** Cálculo de la eficiencia de la amplificación para los genes estudiados.

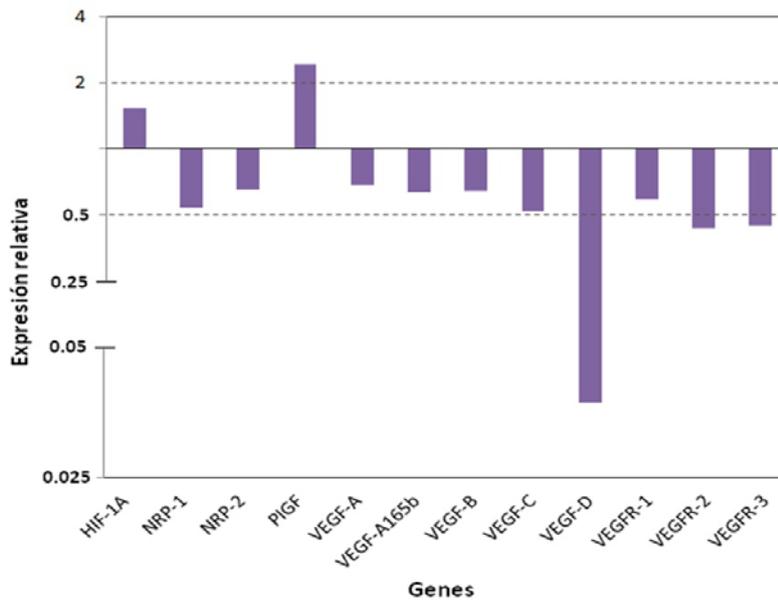
Gen	Pendiente	Eficiencia	Eficiencia en %
<i>VEGF-A</i>	-3.59	1.90	95
<i>VEGF-B</i>	-3.67	1.87	94
<i>VEGF-C</i>	-3.37	1.98	99
<i>VEGF-D</i>	-3.29	2.01	101
<i>PIGF</i>	-3.46	1.97	97
<i>VEGFR-1</i>	-3.35	1.98	98
<i>VEGFR-2</i>	-3.32	2.00	100
<i>VEGFR-3</i>	-3.33	1.99	99
<i>NRP-1</i>	-3.71	1.86	93
<i>NRP-2</i>	-3.76	1.84	92
<i>VEGF-A<sub>165b</sub></i>	-3.48	1.94	97
<i>HIF1-A</i>	-3.35	1.99	99
<i>GUSB</i>	-3.32	2.00	100

## 2.5. Cuantificación de los niveles de expresión génica relativa

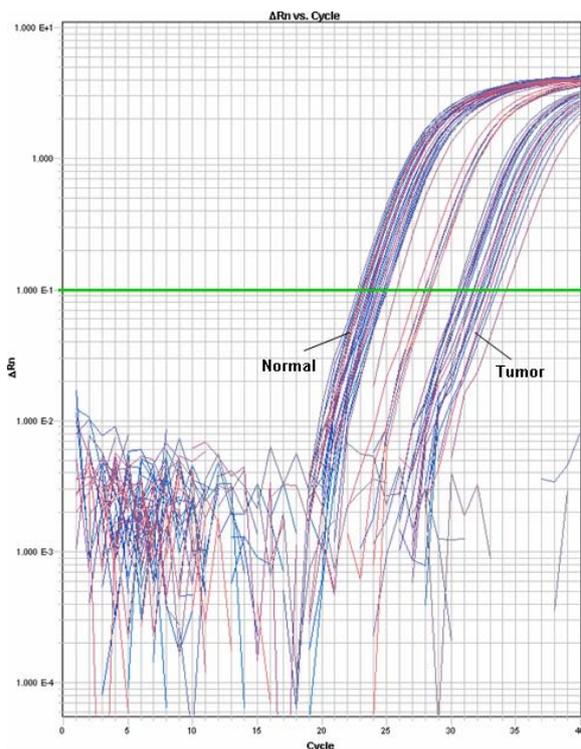
El análisis de la expresión génica relativa de marcadores angiogénicos y linfangiogénicos (*VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *PIGF*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, *VEGFR-3*, *NRP-1*, *NRP-2*, *HIF-1A* y *VEGF-A<sub>165b</sub>*) se realizó en 175 parejas de muestras de tejido tumoral y normal de pacientes con CPNM. Todos los genes analizados pudieron ser amplificados mediante los cebadores y sondas seleccionados.

Los niveles de expresión de los genes estudiados se expresaron como valores de cuantificación relativa. Para ello, tal y como se explica en la sección de Metodología, se empleó el modelo matemático de Michael W. Pfaffl. De esta manera, los resultados expresan la relación entre la expresión del gen problema frente a la de un gen de referencia endógeno (*GUSB*), en la muestra tumoral con respecto al tejido normal del mismo paciente. En la Figura 22 se representan las medianas de los valores de expresión relativa de los 12 genes analizados. En general, se considera que un gen está sobreexpresado cuando la mediana de expresión es superior a 2 (2X), e infraexpresado si la mediana tiene un valor por debajo de 0.5 (0.5X). Por tanto, nuestros resultados

mostraron que PlGF se encontraba sobreexpresado en tejido tumoral en relación con el tejido pulmonar sano (2.76x), mientras que VEGFR-2 (0.42x), VEGFR-3 (0.43x) y VEGF-D (0.035x) se encontraban infraexpresados en tumor. Es de destacar, la marcada infraexpresión de VEGF-D observada en nuestra cohorte. En la Figura 23 se muestra un ejemplo de las curvas de amplificación para este gen, donde podían diferenciarse ya claramente dos subpoblaciones de muestras con valores de Cq muy diferentes, correspondientes al tumor y al tejido normal.



**Figura 22.** Representación de la mediana de expresión relativa de los genes estudiados.



**Figura 23.** Ejemplo de curvas de amplificación para VEGF-D

Los niveles elevados de PIGF también habían sido reportados en otros tumores, como en cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de mama y colorrectal (Chen *et al.*, 2004; Mae *et al.*, 2012; Matsumoto *et al.*, 2003; Parr *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005). Por el contrario, la baja expresión de PIGF en algunos tumores se ha relacionado con la metilación del promotor (Xu and Jain, 2007). También la infraexpresión de VEGF-D en tumor, está en concordancia con lo descrito previamente, usando otras metodologías, tanto en cáncer de pulmón como en otros tipos de cáncer (Charoenrat *et al.*, 2001; George *et al.*, 2001; Maekawa *et al.*, 2007; Niki *et al.*, 2000).

## 2.6. Correlación con las características clínico-patológicas

El análisis de la relación entre las características clínico-patológicas y la expresión génica es necesario a la hora de establecer perfiles genéticos asociados a distintos comportamientos de la enfermedad. Estos análisis se realizaron mediante pruebas no paramétricas (Prueba de *Mann-Whitney* o Prueba de *Kruskal–Wallis*) y con Tablas de Contingencia (estadística  $\chi^2$ ). En la Tabla 22 se resumen los resultados más remarcables de estos análisis.

Se encontraron diferencias significativas entre el sexo de los pacientes y la expresión de PIGF ( $p=0.017$ ), VEGF-A ( $p=0.018$ ), VEGFR-1 ( $p=0.015$ ) y NRP-2 ( $p=0.042$ ), siendo los hombres los que presentaban mayores valores que las mujeres para todos estos marcadores. Estas diferencias podrían tener relación con el pronóstico negativo que parecen presentar los hombres frente a las mujeres (Wakelee *et al.*, 2006; Wheatley-Price *et al.*, 2010; Wisnivesky and Halm, 2007). Además, se encontraron diferencias entre la expresión de PIGF y el subtipo histológico ( $p<0.0001$ ), con mayor sobreexpresión de PIGF en muestras de tipo epidermoide en comparación con los adenocarcinomas. En relación a estos hallazgos, Woo y colaboradores, encontraron también diferencias en los niveles de expresión de PIGF en función de la histología del tumor, siendo mayor en este caso la expresión en CMP que en CPNM (Woo *et al.*, 2004). Estas diferencias en la expresión de PIGF entre histologías podrían estar contribuyendo a la distinta biología de la enfermedad. De hecho, en los últimos años, numerosos informes indican claramente que los subtipos histológicos son biológicamente diferentes en términos de expresión génica, respuesta del tumor a la

terapia, toxicidad del fármaco, y evolución clínica, lo que sugiere que también pueden tener una respuesta potencialmente distinta a la inhibición de la vía del VEGF (Langer *et al.*, 2010; Neal, 2010; Pajares *et al.*, 2012; Wheatley-Price *et al.*, 2010).

**Tabla 22.** Resumen de asociaciones con variables clínico-patológicas.

MARCADOR	VARIABLE		
	<b>Sexo</b>		
	<b>Hombre</b>	<b>Mujer</b>	<b>p</b>
	Mediana de expresión	Mediana de expresión	
<b>PIGF</b>	2.96	1.19	0.017*
<b>VEGF-A</b>	1.00	0.53	0.018*
<b>VEGFR-1</b>	0.68	0.27	0.015*
<b>NRP-2</b>	0.90	0.44	0.042*
	<b>Histología</b>		
	<b>Epidermoide</b>	<b>Adenocarcinoma</b>	<b>p</b>
	Mediana de expresión	Mediana de expresión	
<b>PIGF</b>	4.72	1.95	<0.0001*
	<b>Edad</b>		
	<b>≤65 años</b>	<b>&gt;65 años</b>	<b>p</b>
	Mediana de expresión	Mediana de expresión	
<b>VEGF-D</b>	0.045	0.020	0.040*
	<b>Estadio</b>		
	<b>I</b>	<b>II-III A</b>	<b>p</b>
	Mediana de expresión	Mediana de expresión	
<b>VEGF-D</b>	0.044	0.024	0.015*
	<b>Afectación de nódulos linfáticos</b>		
	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>p</b>
	Mediana de expresión	Mediana de expresión	
<b>VEGF-D</b>	0.039	0.024	0.083

\*p<0.05

Por otro lado, se observó que la expresión de VEGF-D era menor en los pacientes con edad superior a 65 años ( $p=0.040$ ) y en estadios más avanzados (II-III A vs. I) ( $p=0.015$ ). La relación inversa de VEGF-D con el estadio del tumor también había sido descrita por Maekawa y colaboradores, sin embargo estos mismos investigadores no encontraron diferencias significativas con la edad (Maekawa *et al.*, 2007). Por último, cabe destacar que los pacientes con metástasis de nódulos linfáticos presentaron valores más bajos de VEGF-D que los pacientes que no tenían metástasis de nódulos linfáticos ( $p=0.083$ ), indicando un posible efecto antimetastásico de VEGF-D. Diversos

estudios han investigado la relación entre los niveles tanto proteicos como de ARNm de VEGF-C, VEGF-D y su receptor VEGFR-3 en relación con la capacidad de diseminación tumoral. Con respecto al VEGF-C, su expresión está asociada con un peor pronóstico (Pepper *et al.*, 2003) y con la invasión o metástasis de nódulos linfáticos (Bo *et al.*, 2009;Saintigny *et al.*, 2007;Skobe *et al.*, 2001). Sin embargo, la expresión de VEGF-D y su correlación con la metástasis parece menos clara en la literatura (Feng *et al.*, 2010;Juttner *et al.*, 2006;Ko *et al.*, 2008;Maekawa *et al.*, 2007;Nakamura *et al.*, 2003;Niki *et al.*, 2000;White *et al.*, 2002;Yokoyama *et al.*, 2003).

## **2.7. Análisis del valor pronóstico del estudio de expresión de genes angiogénicos/linfangiogénicos**

### **2.7.1. Análisis del valor pronóstico de los marcadores de manera individual**

En esta cohorte de 175 pacientes en los cuales se analizó la expresión génica de marcadores angiogénicos y linfangiogénicos, la mediana de seguimiento fue de 22 meses (0.4-80.6). Un total de 68 de los 175 pacientes (38,9%) progresaron y 65 pacientes (37.1%) fallecieron. Las medianas de TLP y SG para la población total fueron de 45.8 meses y 67 meses, respectivamente.

El análisis de la influencia de los niveles de expresión de los genes estudiados en el pronóstico de los pacientes se realizó para el TLP y la SG mediante el método *Kaplan-Meier* empleando el estadístico log-rango. Para ello, las variables continuas se dicotomizaron en grupos de niveles altos y bajos utilizando como valor de corte la mediana de expresión de cada gen.

En la Tabla 23 se muestra un resumen del análisis univariante mediante el método *Kaplan-Meier* para variables clínico-patológicas y marcadores angiogénicos estudiados en esta cohorte.

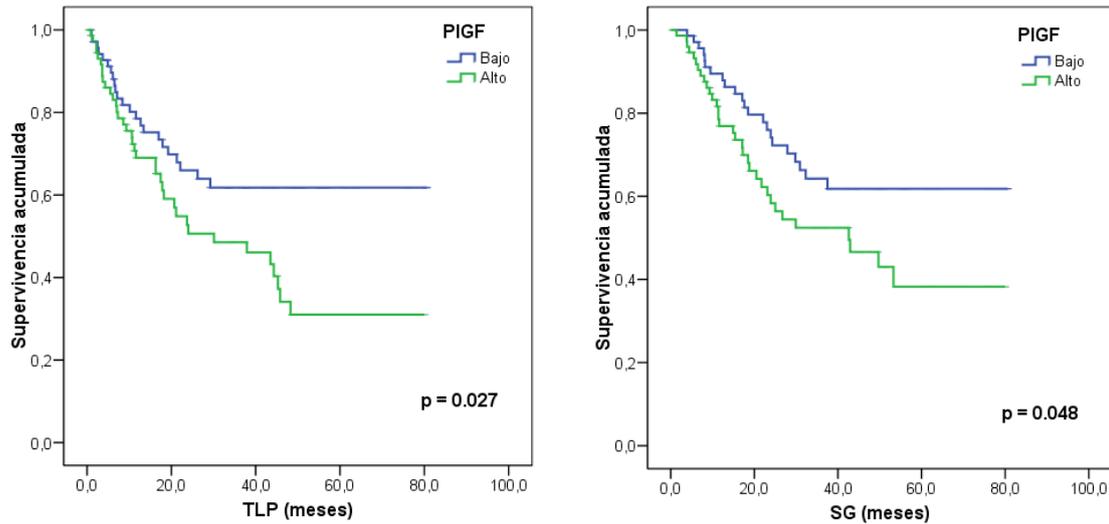
**Tabla 23.** Análisis de supervivencia de variables clínico-patológicas y marcadores angiogénicos. Análisis univariante (*Kaplan-Meier*, estadístico Log-rango).

VARIABLES	TLP		SG	
	Mediana de progresión (meses)	<i>p</i>	Mediana de supervivencia (meses)	<i>p</i>
<b>Edad (años)</b>				
≤65	NA	0.448	NA	0.306
>65	37.9		53.3	
<b>Sexo</b>				
Mujeres	NA	0.382	NA	0.335
Hombres	45.3		53.3	
<b>ECOG-PS</b>				
0	NA	0.033*	NA	0.021*
1/2	18.2		23.9	
<b>Histología</b>				
Epidermoide	45.8	0.119	NA	0.122
Adenocarcinoma	45.3		67	
Otros	11.2		18.5	
<b>Estadío</b>				
I	48.3	0.195	NA	0.686
II	26.2		42.9	
IIIA	24.0		43.0	
<b>Tamaño tumoral <sup>a</sup></b>				
≤3.5 cm	NA	0.004*	NA	0.024*
>3.5 cm	20.7		37.5	
<b>Afectación de nódulos linfáticos</b>				
N0	48.3	0.067	67.0	0.101
N1/N2	24.0		30.9	
<b>Grado de diferenciación</b>				
Bien diferenciado	29.2	0.602	NA	0.439
Moderado	48.3		53.3	
Poco diferenciado	44.3		49.7	
<b>EGFR</b>				
Nativo	43.5	0.756	53.3	0.767
Mutado	16.3		42.9	
<b>Hábito tabáquico</b>				
No fumador	NA	0.953	NA	0.203
Exfumador	48.3		49.5	
Fumador activo	44.3		NA	
<b>HIF1-A</b>				
Bajo	48.3	0.737	53.3	0.504
Alto	44.3		NA	
<b>VEGF-A</b>				
Bajo	NA	0.024*	NA	0.050*
Alto	21.1		42.9	
<b>VEGF-A<sub>165b</sub></b>				
Bajo	48.3	0.909	67.0	0.450
Alto	45.3		49.7	

<b>VEGF-B</b>				
Bajo	22.1	0.020*	27.9	0.003*
Alto	NA		NA	
<b>VEGF-C</b>				
Bajo	42.8	0.787	45.6	0.271
Alto	NA		67.0	
<b>VEGF-D</b>				
Bajo	23.7	0.135	42.6	0.089
Alto	NR		NR	
<b>PIGF</b>				
Bajo	NA	0.027*	NA	0.048*
Alto	30.1		42.6	
<b>VEGFR-1</b>				
Bajo	NA	0.470	53.3	0.763
Alto	44.3		NA	
<b>VEGFR-2</b>				
Bajo	40.3	0.613	42.6	0.164
Alto	45.3		67.0	
<b>VEGFR-3</b>				
Bajo	NA	0.697	67.0	0.682
Alto	43.5		53.3	
<b>NRP-1</b>				
Bajo	50.3	0.297	53.3	0.719
Alto	43.5		49.7	
<b>NRP-2</b>				
Bajo	NA	0.303	30.9	0.061
Alto	43.5		67.0	

<sup>a</sup>Tamaño tumoral dicotomizado según la mediana; \*p<0.05; TLP, tiempo libre de progresión; SG, supervivencia global; NA, no alcanzada; ↑, Alta expresión; ↓, Baja expresión

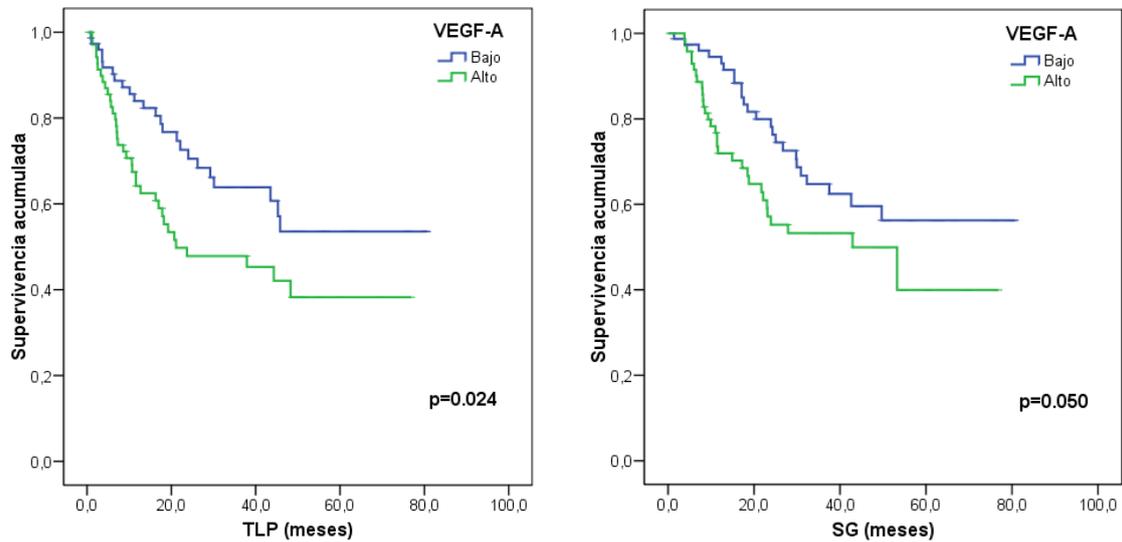
Los análisis de supervivencia mostraron que los pacientes con niveles altos para PIGF presentaban TLP y SG más cortos que los pacientes con niveles bajos de PIGF (p=0.027 y p=0.048, respectivamente) (Figura 24, Tabla 23). La relación de PIGF con el pronóstico negativo también había sido reportada previamente para otros tipos de cáncer (Cheng *et al.*, 2010; Mae *et al.*, 2012; Parr *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005).



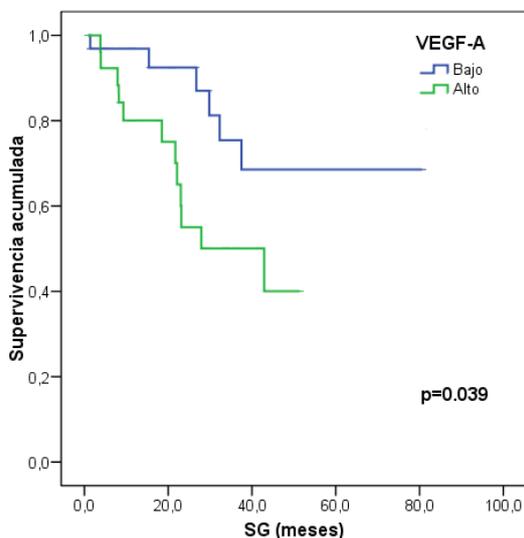
**Figura 24.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión relativa de PIGF. La línea azul representa los casos con niveles de bajos de PIGF, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de PIGF.

De manera similar, se encontró que la expresión de VEGF-A diferenciaba dos grupos de pacientes con diferente pronóstico, siendo los pacientes con niveles más elevados de VEGF-A los que presentaban TLP y SG más cortos ( $p=0.024$  y  $p=0.050$ ) (Figura 25, Tabla 23). En este caso además, los análisis restringidos en función del subgrupo histológico, mostraron las mismas diferencias para los grupos con niveles altos y bajos de VEGF-A pero con mayor poder estadístico para la SG ( $p=0.039$ ) (Figura 26); mientras que no se encontraron diferencias significativas en el caso de los pacientes con el subtipo epidermoide. También los análisis de supervivencia acotados al subgrupo con *EGFR* nativo mostraron las mismas diferencias pronósticas pero con mayor significación para el TLP y la SG ( $p=0.014$  y  $p=0.004$ ) (Figura 27); mientras que no se encontraron diferencias significativas en el caso de los pacientes con la mutación de *EGFR*. VEGF-A, es el más estudiado de los factores angiogénicos y se ha asociado con mal pronóstico en la mayoría de estudios (Bremnes *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2009). Además, según el meta-análisis de Zhan y en concordancia con nuestros resultados, el análisis limitado a los pacientes con histología adenocarcinoma muestra el peor pronóstico en relación a las otras histologías (Zhan *et al.*, 2009). Sin embargo, una nueva variante de procesamiento alternativo de VEGF-A, que podría estar asociada con propiedades antiangiogénicas (VEGF-A<sub>165b</sub>), fue identificada en el año 2002 (Bates *et al.*, 2002). Por ello, en este estudio se investigó el papel de VEGF-A<sub>165b</sub> en nuestra cohorte de pacientes. Los resultados mostraron que no había asociación significativa

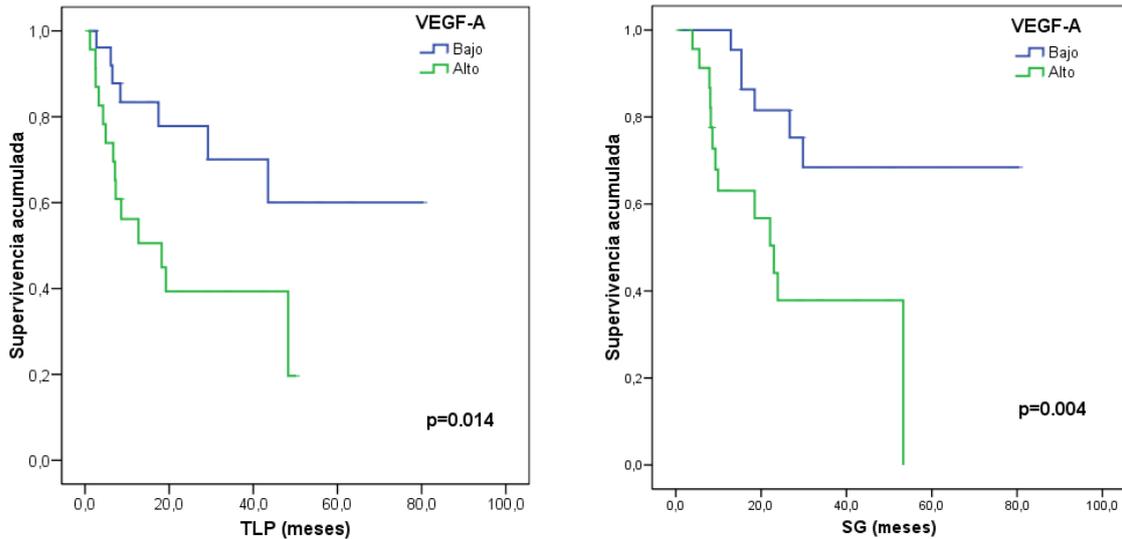
de VEGF-A<sub>165b</sub> con el pronóstico de los pacientes, por tanto, coincidiendo con Das y colaboradores (Das *et al.*, 2007), no conseguimos encontrar para esta variante el efecto antiangiogénico o inhibitorio sobre el crecimiento del tumor que postularon otros autores (Bates *et al.*, 2002; Manetti *et al.*, 2011; Woolard *et al.*, 2004) al menos a nivel de expresión de mRNA. De todas maneras, se sabe que existen otros niveles de regulación de la expresión génica que pueden afectar los niveles de la proteína o incluso mecanismos de procesamiento post-transcripcionales que afectan la funcionalidad proteica y pueden tener relación con el efecto inhibitorio descrito de la isoforma VEGF-A<sub>165b</sub>.



**Figura 25.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión relativa de VEGF-A. La línea azul representa los casos con niveles de bajos de VEGF-A, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de VEGF-A.



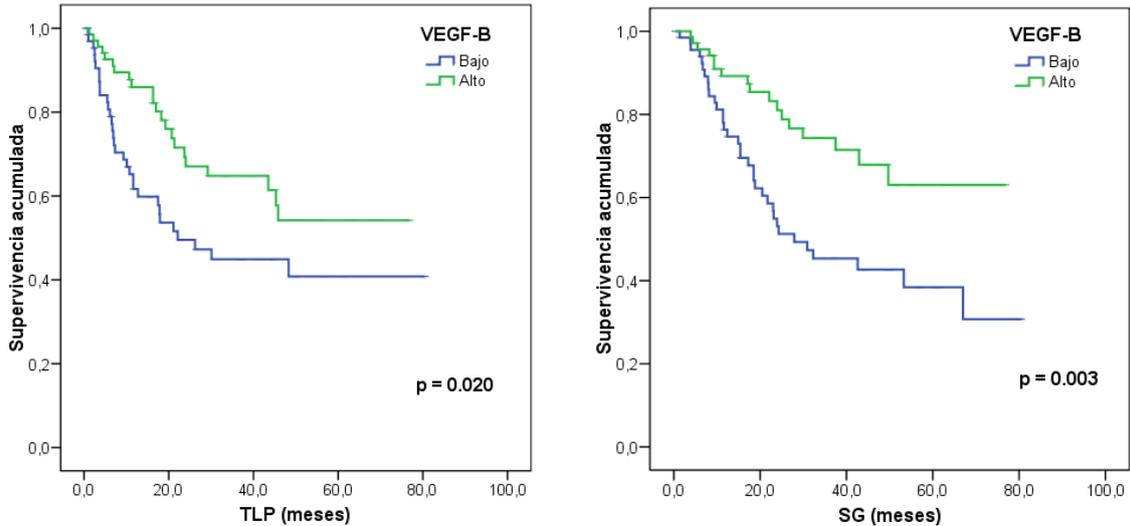
**Figura 26.** Gráfico de *Kaplan-Meier* de SG para la expresión relativa de VEGF-A en pacientes con histología adenocarcinoma. La línea azul representa los casos con niveles de VEGF-A bajos, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de VEGF-A.



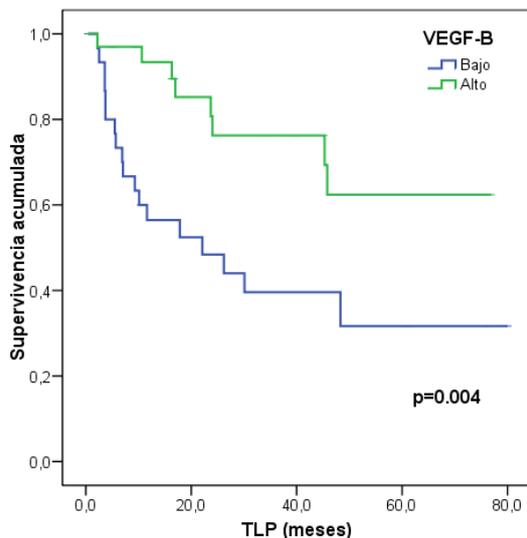
**Figura 27.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión relativa de VEGF-A en pacientes con *EGFR* nativo. La línea azul representa los casos con niveles de bajos de VEGF-A, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de VEGF-A.

Contrariamente, los análisis de supervivencia para VEGF-B mostraron un efecto opuesto al descrito para PIGF y VEGF-A, ya que en este caso, los pacientes con niveles bajos fueron los que presentaron peores TLP y SG que los pacientes con niveles elevados ( $p=0.020$  y  $p=0.003$ ) (Figura 28, Tabla 23). Además, el análisis restringido a los pacientes de histología epidermoide mostró estas mismas diferencias pero con mayor significación estadística para el TLP ( $p=0.004$ ) (Figura 29); mientras que las diferencias no fueron significativas en el análisis limitado a los pacientes de histología adenocarcinoma. En referencia a VEGF-B hay menos estudios realizados, pero también se ha encontrado expresado en diferentes tipos tumorales (Salven *et al.*, 1998) incluyendo el cáncer de pulmón (Carrillo de Santa *et al.*, 2009; Niki *et al.*, 2000). Sin embargo, en cuanto a su papel pronóstico en la enfermedad, existen escasos datos en la literatura y resultan poco concluyentes. Usando técnicas de inmunohistoquímica, se reportó que la expresión de VEGF-B resultaba ser un marcador desfavorable en el pronóstico de pacientes con cáncer de mama con nódulos positivos (Mylona *et al.*, 2007). Por otro lado en CPNM, se observó que los niveles moderados/altos de VEGF-B se relacionan con un peor pronóstico solo cuando se limitaban los análisis a pacientes en estadios I-II; mientras que la relación, aunque no significativa, parecía opuesta cuando se trataba de los estadios III-IV o del conjunto global de la población (Carrillo de Santa *et al.*, 2009). Por el contrario, en nuestra cohorte de pacientes con CPNM en

estadios resecables, los datos indicaron justamente lo contrario a estos dos autores, ya que la expresión elevada de VEGF-B resultó ser de mejor pronóstico. Los niveles elevados de VEGF-B podrían competir con PlGF y VEGF-A en la unión a su receptor o incluso suscitar una mayor formación de heterodímeros con VEGF-A, cuyo significado biológico es desconocido, pero que podría representar un mecanismo para modular la liberación y disponibilidad de VEGF-A (Nash *et al.*, 2006).



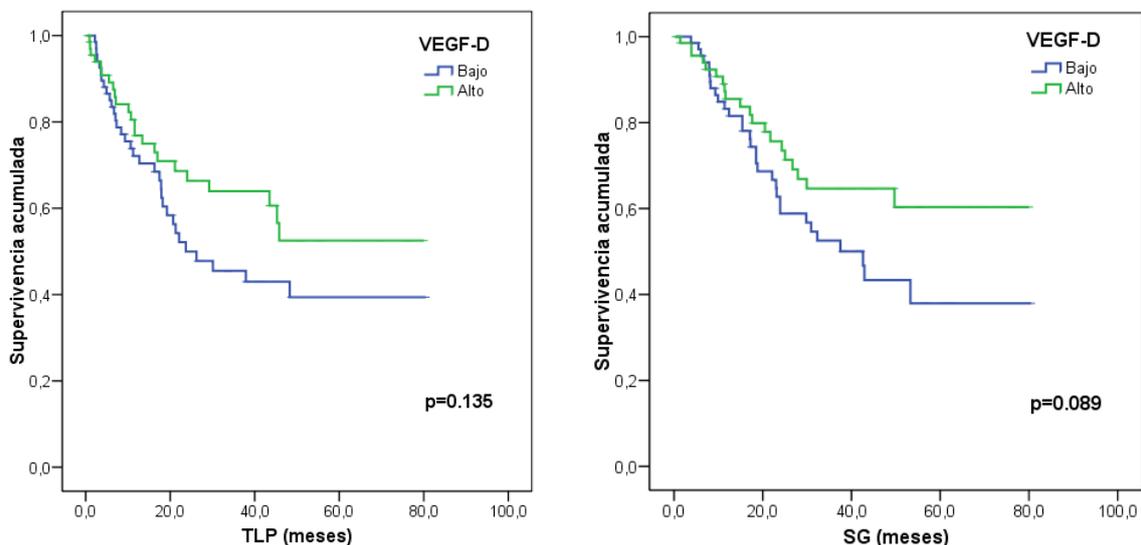
**Figura 28.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión relativa de VEGF-B. La línea azul representa los casos con niveles de bajos de VEGF-B, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de VEGF-B.



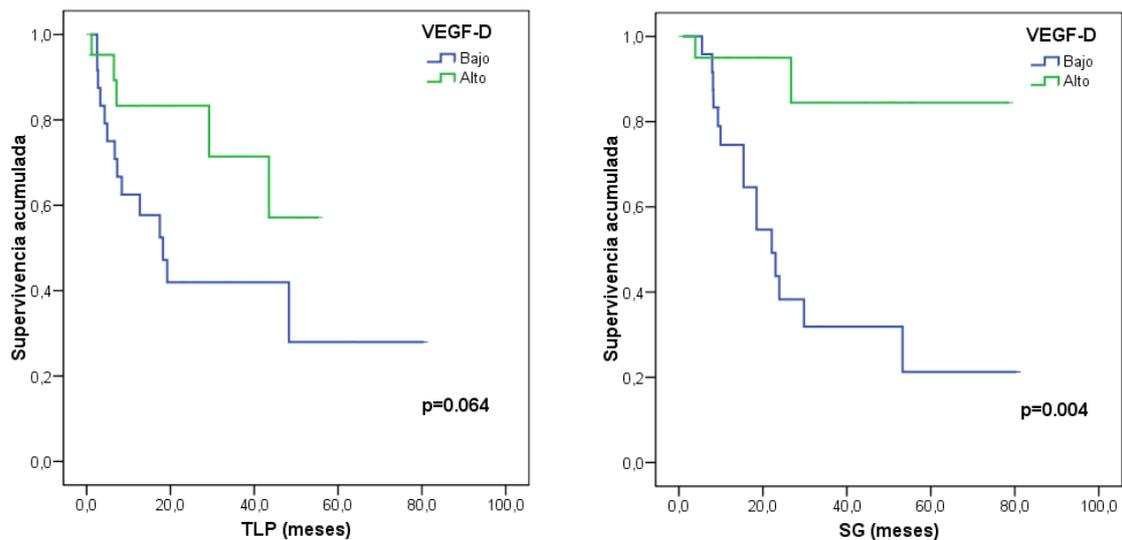
**Figura 29.** Gráfico de *Kaplan-Meier* de TLP para la expresión relativa de VEGF-B en pacientes con histología epidermoide. La línea azul representa los casos con niveles de VEGF-B bajos, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de VEGF-B.

En el caso de VEGF-D, los resultados indicaron que los niveles bajos se relacionan con peores pronósticos, ya que se observó una tendencia a menores TLP ( $p=0.135$ ) y

SG ( $p=0.089$ ) para los pacientes con niveles bajos en comparación con los pacientes con niveles altos de este marcador. Es importante señalar que aunque estas diferencias no fueron significativas, las curvas de *Kaplan-Meier* evidencian esta observación (Figura 30, Tabla 23). Además, los análisis de supervivencia acotados al subgrupo con *EGFR* nativo mostraron las mismas diferencias pronósticas pero con mayor significación para el TLP y la SG ( $p=0.064$  y  $p=0.004$ ) (Figura 31); mientras que no se encontraron diferencias en el caso de los pacientes con la mutación de *EGFR*. Por tanto, los análisis de supervivencia para VEGF-D parecen indicar que existe una relación entre la regulación a la baja de VEGF-D y un posible efecto antimetastásico. Sin embargo, los datos en la literatura en relación a la asociación de VEGF-D y el pronóstico están poco claros. Algunos autores apoyan también la hipótesis de que los niveles bajos de VEGF-D se asocian con un peor pronóstico (Anagnostou *et al.*, 2011; Maekawa *et al.*, 2007), otros indican que VEGF-D es un predictor desfavorable (Juttner *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2003; White *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2003) e incluso en otros casos los datos resultan contradictorios en función del estadio de los pacientes (Carrillo de Santa *et al.*, 2009).



**Figura 30.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión relativa de VEGF-D. La línea azul representa los casos con niveles de bajos de VEGF-D, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de VEGF-D.



**Figura 31.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión relativa de VEGF-D en pacientes con *EGFR* nativo. La línea azul representa los casos con niveles de bajos de VEGF-D, mientras que la línea verde representa los casos con niveles altos de VEGF-D.

Por último, los análisis de supervivencia no mostraron asociaciones significativas con el TLP y la SG para los niveles de expresión génica de VEGF-A<sub>165b</sub>, VEGF-C, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1, NRP-2 y HIF-1A, como muestra la Tabla 23.

### 2.7.2. Análisis del valor pronóstico de los marcadores combinados

En vista de estos resultados observados y con el fin de evaluar mejor el pronóstico de los pacientes, se decidió abordar la combinación de marcadores en función de los perfiles de expresión de los genes analizados y teniendo en cuenta las interacciones que existen entre ellos. Para ello, se combinaron las expresiones de PIGF, VEGF-A, VEGF-B y también VEGF-D, ya que aunque este último marcador no alcanzó significación estadística, sí permitió distinguir claramente el pronóstico de los pacientes, tal y como se muestra en la Figura 30.

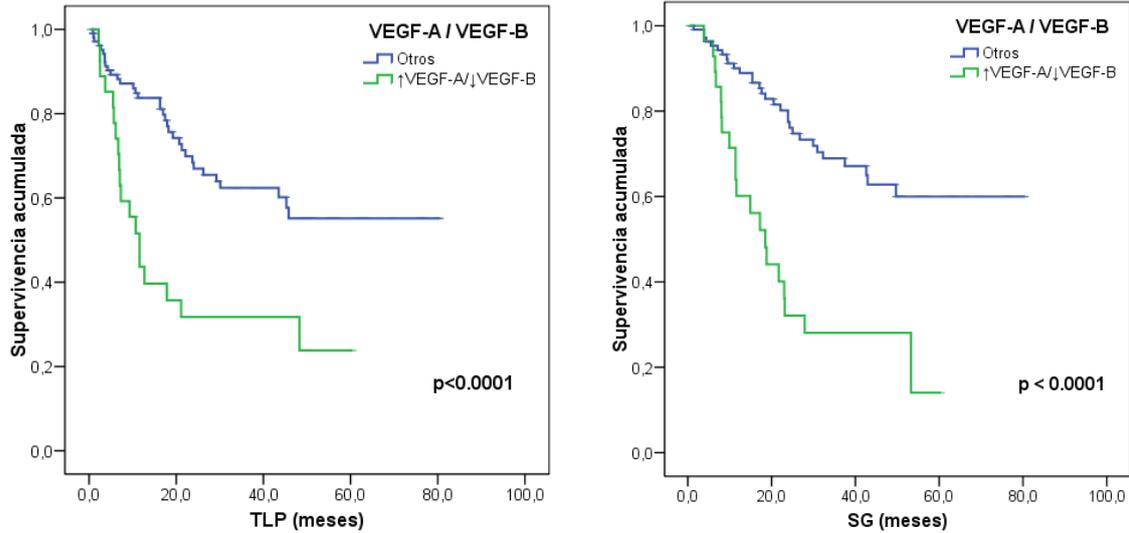
En la Tabla 24 se muestra un resumen del análisis univariante mediante el método *Kaplan-Meier* para variables combinadas.

**Tabla 24.** Análisis de supervivencia de variables combinadas. Análisis univariante (*Kaplan-Meier*, estadístico Log-rango).

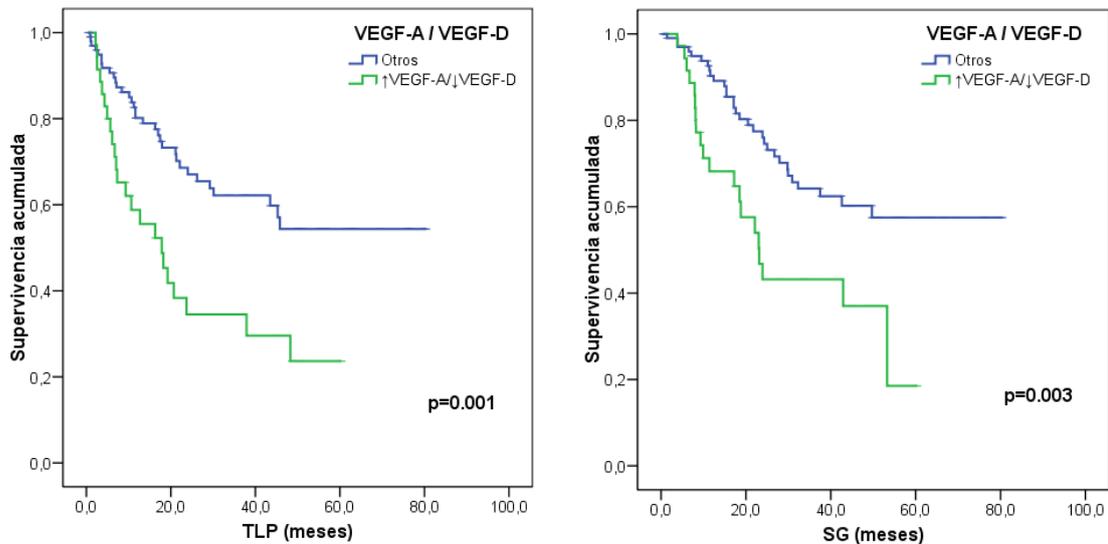
VARIABLES	TLP		SG	
	Mediana de progresión (meses)	p	Mediana de supervivencia (meses)	p
<b>VEGF-A/VEGF-B</b> ↑VEGF-A/↓VEGF-B Otros	11.6 NA	<0.0001*	18.5 NA	<0.0001*
<b>VEGF-A/VEGF-D</b> ↑VEGF-A/↓VEGF-D Otros	17.8 NA	0.001*	23.1 NA	0.003*
<b>VEGF-A/PIGF</b> ↑VEGF-A/↑PIGF Otros	18.2 NA	0.001*	23.1 NA	0.008*
<b>VEGF-B/PIGF</b> ↓VEGF-B/↑PIGF Otros	17.5 NA	<0.0001*	18.5 NA	<0.0001*
<b>VEGF-A/PIGF/VEGF-B</b> ↑VEGF-A/↑PIGF/↓VEGF-B Otros	7.3 NA	<0.0001*	14.9 NA	<0.0001*
<b>VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D</b> ↑VEGF-A/↓VEGF-B/↓VEGF-D Otros	7.0 NA	<0.0001*	17.2 NA	<0.0001*
<b>VEGF-A/PIGF/VEGF-B/VEGF-D</b> ↑VEGF-A/↑PIGF/↓VEGF-B/↓VEGF-D Otros	7.3 NA	0.001*	17.2 NA	0.001*

\* $p < 0.05$ ; TLP, tiempo libre de progresión; SG, supervivencia global; NA, no alcanzada; ↑, Alta expresión; ↓, Baja expresión

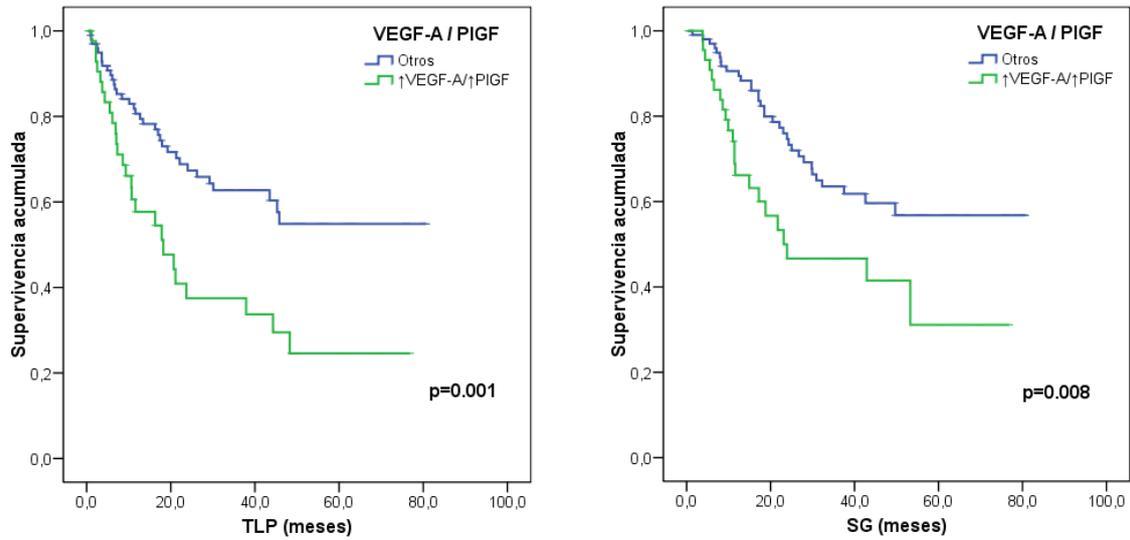
Para este análisis, primero se realizaron combinaciones de dos marcadores, definiendo como grupo de mal pronóstico en cada caso aquel caracterizado por combinar el patrón de expresión de mal pronóstico para los dos marcadores combinados. Cada una de estas combinaciones fue comparada con las otras posibles opciones de combinación de los dos marcadores en cuestión. El análisis de supervivencia para las combinaciones de dos marcadores mostró que las siguientes combinaciones, VEGF-A/VEGF-B, VEGF-A/VEGF-D, VEGF-A/PIGF y VEGF-B/PIGF, permitían diferenciar grupos de pacientes con pronósticos negativos para TLP y SG aún con mayor significación estadística que estas variables analizadas individualmente (Figuras 32- 35 y Tabla 24).



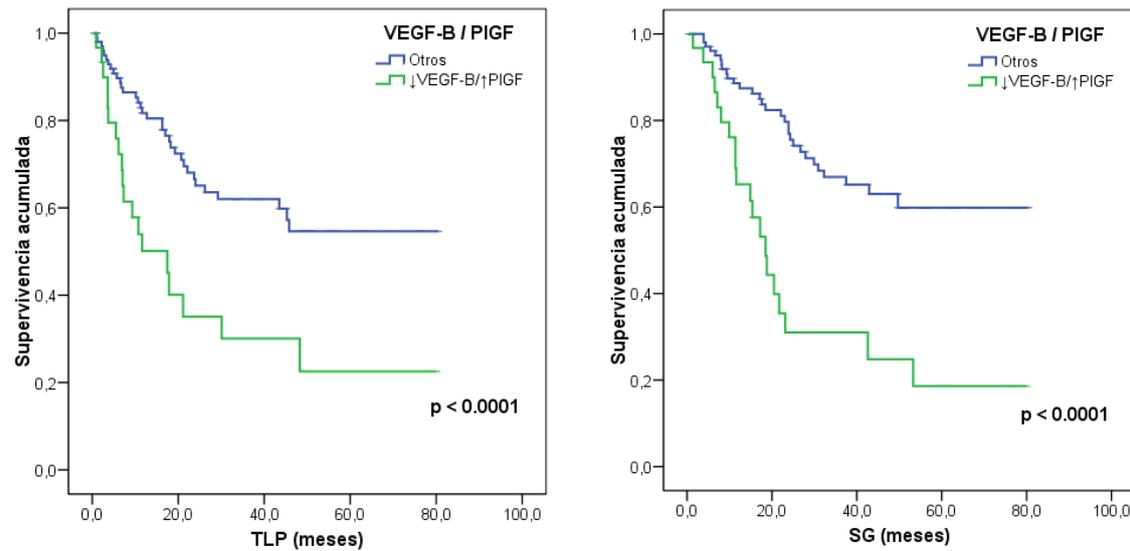
**Figura 32.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión combinada de VEGF-A y VEGF-B. La línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A altos y VEGF-B bajos, mientras que la línea azul representa el resto de los casos.



**Figura 33.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión combinada de VEGF-A y VEGF-D. La línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A altos y VEGF-D bajos, mientras que la línea azul representa el resto de los casos.



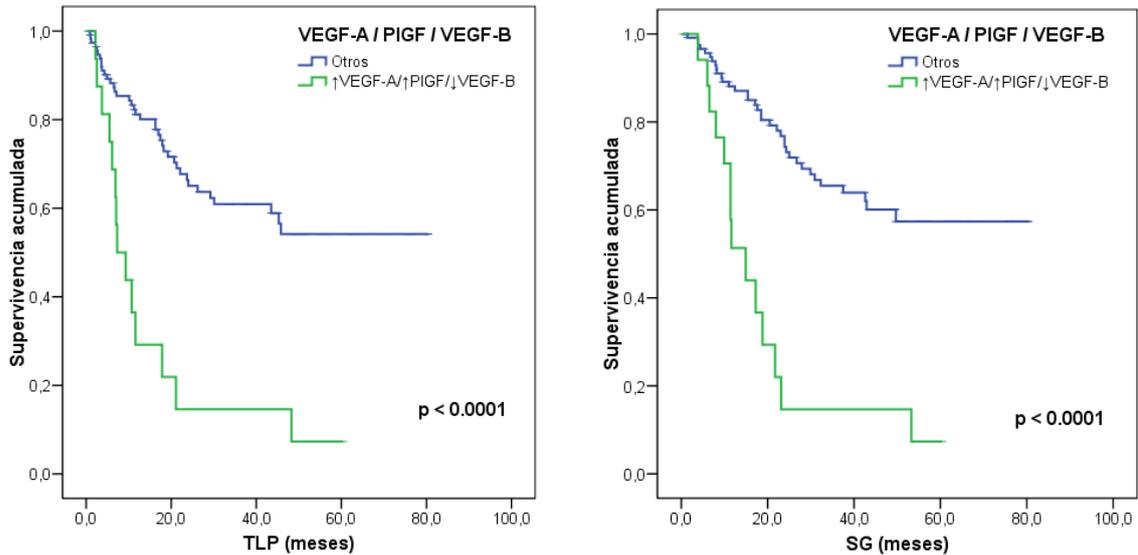
**Figura 34.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión combinada de VEGF-A y PIGF. La línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A y PIGF altos, mientras que la línea azul representa el resto de los casos.



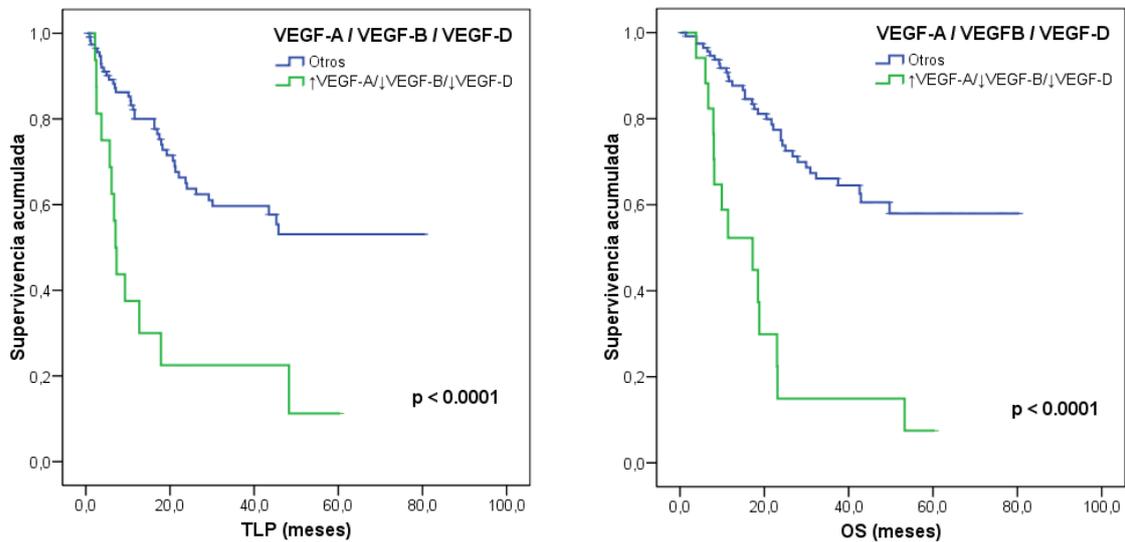
**Figura 35.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión combinada de VEGF-B y PIGF. La línea verde representa los casos con niveles de VEGF-B bajos y PIGF altos, mientras que la línea azul representa el resto de los casos.

A continuación se analizaron combinaciones de tres marcadores. En este análisis se encontró que los perfiles de expresión de los grupos de pacientes con peor pronóstico en TLP y SG se caracterizaban por presentar niveles altos de VEGF-A y PIGF y niveles bajos de VEGF-B ( $\uparrow$ VEGF-A/ $\uparrow$ PIGF/ $\downarrow$ VEGF-B) o por presentar niveles altos de VEGF-A y niveles bajos de VEGF-B y VEGF-D ( $\uparrow$ VEGF-A/ $\downarrow$ VEGF-B/ $\downarrow$ VEGF-D). Estas dos variables que combinan tres marcadores mostraron ser igual de buenas en términos

estadísticos y en la predicción del pronóstico de los pacientes (Figuras 36 y 37 y Tabla 24).



**Figura 36.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión combinada de VEGF-A, PIGF y VEGF-B. La línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A y PIGF altos y VEGF-B bajos, mientras que la línea azul representa el resto de los casos.



**Figura 37.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG para la expresión combinada de VEGF-A, VEGF-B y VEGF-D. La línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A altos y VEGF-B y VEGF-D bajos, mientras que la línea azul representa el resto de los casos.

Además, se contempló la combinación de los cuatro marcadores (PlGF, VEGF-A, VEGF-B y VEGF-D), pero esta variable no resultó ser mejor en términos de significación estadística en comparación con las combinaciones mencionadas anteriormente (Tabla 24).

Las interacciones entre los miembros de la vía de señalización de VEGF son complejas, ya que los diferentes miembros de la familia y las diferentes isoformas interactúan entre sí modulando su señalización de manera sinérgica y en ciertos casos, antagónica. Es por ello que se decidió abordar el análisis de la combinación de marcadores. Los resultados de estos análisis mostraron que estas combinaciones permitían diferenciar entre grupos de pacientes con diferentes pronósticos aún con mayor significación estadística que las variables analizadas individualmente. De manera similar, encontramos en la literatura otras aproximaciones a la comprensión de los mecanismos de angiogénesis y linfangiogénesis mediante el estudio de los perfiles de expresión de varios miembros de la familia de VEGF (Donnem *et al.*, 2010; Niki *et al.*, 2000; Pajares *et al.*, 2012).

Por tanto, los resultados encontrados en estos análisis y expuestos anteriormente, apoyan la hipótesis de que los mayores mediadores en el proceso angiogénico serían VEGF-A y PlGF, ya que su alta expresión determina un peor pronóstico. Mientras que VEGF-B y VEGF-D podrían actuar como agonistas competitivos de VEGF-A y PlGF pero con menor acción angiogénica y linfangiogénica, o incluso como antagonistas o inhibidores de su acción, ya que VEGF-B y VEGF-D se unen a los mismos receptores que VEGF-A y PlGF (VEGFR-1 y VEGFR-2 respectivamente). Por consiguiente, los niveles bajos de VEGF-B y VEGF-D, que determinan un peor pronóstico en los pacientes, estarían permitiendo además a VEGF-A y PlGF incrementar su acción a través de los dos receptores. En este sentido, Sands y colaboradores estudiaron también la compleja interacción de estos mediadores angiogénicos en el pulmón hipóxico, situación que refleja lo que ocurre en el microambiente tumoral. Sus resultados indicaron que VEGF-B podía inhibir las acciones de VEGF-A, mientras que PlGF podía contrarrestar esta inhibición; pero ambos efectos de inhibición y potenciación de la acción de VEGF-A dependían de sus concentraciones específicas (Sands *et al.*, 2011). Otro estudio sobre la interacción entre estos factores es el de Moffat, en el que

generaban líneas celulares que infraexpresaban o sobreexpresaban VEGF-A para estudiar los cambios producidos. Según sus resultados, la infraexpresión de VEGF-A no resultaba en la completa inhibición de la angiogénesis y observaban además un aumento en la expresión de VEGF-D, el cual plantean que podría resultar ser una vía alternativa, competitiva o secundaria para la angiogénesis (Moffat *et al.*, 2006).

### 2.7.3. Análisis multivariante de Cox

El análisis multivariante se realizó según el método de regresión de Cox, con el fin de revelar cuáles de las variables analizadas eran de pronóstico independiente para nuestra cohorte de pacientes con CPNM. En este análisis se incluyeron las variables clínico-patológicas así como las variables de expresión génica analizadas (individuales y combinadas) que fueron significativas para el análisis univariante de *Kaplan-Meier* ( $p \leq 0.05$ ) (ver Tabla 23 y Tabla 24).

De acuerdo con el análisis de regresión de Cox, las variables de pronóstico independiente para el TLP fueron el tamaño tumoral y la variable combinada VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D ( $p=0.004$  y  $p<0.0001$ , respectivamente). En el caso de la SG, el análisis multivariante reveló que las variables de pronóstico independiente fueron el tamaño tumoral, la expresión de VEGF-B y la variable combinada VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D ( $p=0.015$ ,  $p=0.019$  y  $p=0.001$ , respectivamente). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 25.

**Tabla 25.** Análisis de regresión de Cox para TLP y SG.

VARIABLES	TLP			SG		
	HR	95% IC	<i>p</i>	HR	95% IC	<i>p</i>
<b>Tamaño tumoral<sup>a</sup></b>						
≥3.5 cm	2.30	1.30-4.05	0.004*	2.10	1.16-3.82	0.015*
<3.5 cm	1.00			1.00		
<b>VEGF-B</b>						
Bajo	-	-	-	2.31	1.14-4.65	0.019*
Alto				1.00		
<b>VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D</b>						
↑VEGF-A/↓VEGF-B/↓VEGF-D	4.32	2.26-8.28	<0.0001**	3.28	1.61-6.67	0.001**
Otros	1.00			1.00		

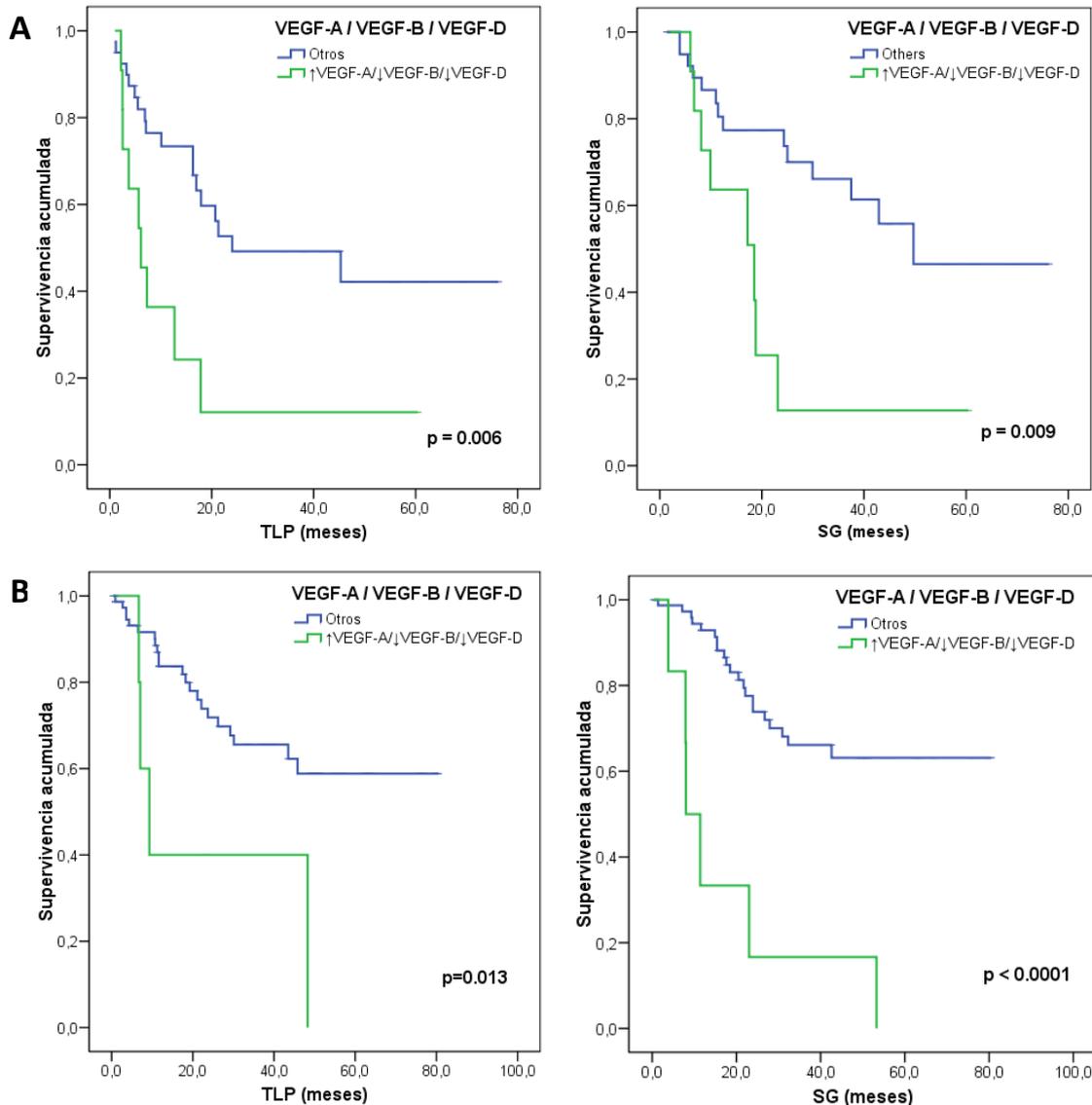
<sup>a</sup>Tamaño tumoral dicotomizado según la mediana; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; TLP, tiempo libre de progresión; SG, supervivencia global; ↑, Alta expresión; ↓, Baja expresión; HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza.

La comparación de las características clínico-patológicas del subgrupo de pacientes de mal pronóstico, representado por aquellos pacientes que presentaron altos niveles de expresión de VEGF-A y bajos niveles de VEGF-B y VEGF-D, con el grupo de pacientes de buen pronóstico (otras posibles combinaciones de estas tres variables) mostró que no había diferencias significativas en el rango de edad ni en las frecuencias de los tipos histológicos, estadios, ECOG-PS, sexo y hábito tabáquico de ambos subgrupos, como se muestra en la Tabla 26; sugiriendo que las diferencias encontradas en TLP y SG se debían a los diferentes niveles de VEGF-A, VEGF-B y VEGF-D. Además, el valor pronóstico de la combinación de VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D tampoco resultó estar influenciado por el tratamiento postoperatorio, ya que se mantuvo incluso cuando se analizaron los pacientes en función de si habían o no recibido terapia adyuvante (pacientes tratados con quimioterapia adyuvante o quimio/radioterapia en comparación con pacientes no tratados) como muestra la Figura 38.

**Tabla 26.** Características de los pacientes en función de la combinación de los niveles de VEGF-A, VEGF-B y VEGF-D.

Características de los pacientes	↑VEGF-A/↓VEGF-B/↓VEGF-D		Otros		<i>p</i> <sup>a</sup>
	No.	%	No.	%	
<b>Total</b>	23	100	130	100	
<b>Edad</b>					
Mediana	66		62		0.108
Rango	47-85		26-82		
<b>Sexo</b>					
Hombre	23	100	111	85.4	0.058
Mujer	0	0	19	14.6	
<b>ECOG-PS</b>					
0	13	56.5	99	76.2	
1	10	43.5	30	23.0	0.115
2	0	0	1	0.8	
<b>Histología</b>					
Epidermoide	13	56.5	61	46.9	
Adenocarcinoma	8	34.8	50	38.5	0.625
Otros	2	8.7	19	14.6	
<b>Estadio</b>					
I	9	39.2	68	52.3	
II	7	30.4	33	25.4	0.493
IIIA	7	30.4	29	22.3	
<b>Hábito tabáquico</b>					
Fumador activo	9	39.1	63	48.5	
Exfumador	13	56.5	53	40.8	0.315
No fumador	1	4.4	14	10.7	

<sup>a</sup>*p* calculada mediante la prueba de Mann Whitney en el caso de la edad, y mediante la prueba de  $\chi^2$  en el caso de las otras variables no continuas; ↑, Alta expresión; ↓, Baja expresión.



**Figura 38.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TTP y SG para la expresión combinada de VEGF-A, VEGF-B y VEGF-D en (A) pacientes que recibieron tratamiento adyuvante y (B) pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante. La línea verde representa los casos con niveles de VEGF-A altos y VEGF-B y VEGF-D bajos, mientras que la línea azul representa el resto de los casos.

#### 2.7.4. Búsqueda de una firma genética asociada con mal pronóstico

Partiendo de la base de los resultados descritos en los apartados previos, y con el fin de buscar una firma genética con aplicabilidad en la práctica clínica, se procedió a la generación de una ecuación que combinara los marcadores angiogénicos que mostraron capacidad para predecir el pronóstico de los pacientes.

Para generar la firma genética que pudiera identificar los pacientes con mayor riesgo de progresión o muerte, se construyó una ecuación de riesgo o *Risk Score* para

la cual se partió de los resultados del estudio multivariante creado para el TLP en el que se incluyeron las variables VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D y PIGF. El resultado de este análisis mostró que las variables más estables y por tanto, las incluibles en la ecuación fueron VEGF-A, VEGF-B y PIGF, quedando VEGF-D fuera del modelo. Los HR proporcionados por este modelo multivariante se redondearon multiplicando por 10 y eliminando los decimales. A continuación, se realizó un reparto proporcional del valor de cada uno de los marcadores y finalmente, este valor obtenido se redondeó multiplicando por 10 y eliminando los decimales (Ver Tabla 27). El valor final otorgado a cada marcador representa el peso específico de cada uno de ellos en la ecuación, quedando finalmente del siguiente modo:

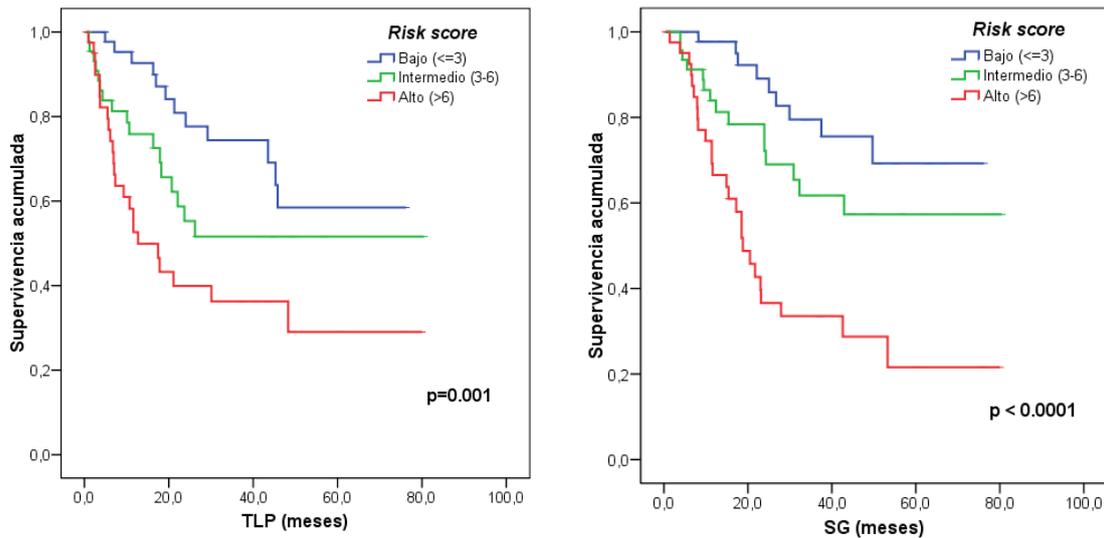
$$\text{Risk Score (RS)} = 3*\text{PIGF} + 3*\text{VEGF-A} + 4*\text{VEGF-B}$$

**Tabla 27.** Resultado del análisis de Cox y creación de una ecuación con tres genes.

Variables	HR	95% IC	p	Reparto proporcional del valor	Valor en la ecuación
<b>PIGF</b>					
Alto	2.05	1.16-3.62	0.014*	20/63 = 0.317	3
Bajo	1.00				0
<b>VEGF-A</b>					
Alto	2.01	1.15-3.51	0.014*	20/63 = 0.317	3
Bajo	1.00				0
<b>VEGF-B</b>					
Bajo	2.30	1.31-4.00	0.004*	23/63 = 0.365	4
Alto	1.00				0

\*p<0.05; HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza.

A partir de la ecuación generada se clasificó a los pacientes en tres grupos de riesgo: Bajo ( $RS \leq 3$ ), Intermedio ( $RS = 3-6$ ) y Alto ( $RS \geq 6$ ). Interesantemente, el análisis de supervivencia de los pacientes en función del grupo de riesgo al que pertenecían mostró diferencias significativas para el TLP y SG ( $p=0.001$  y  $p< 0.0001$ , respectivamente) entre estos tres grupos (Figura 39).



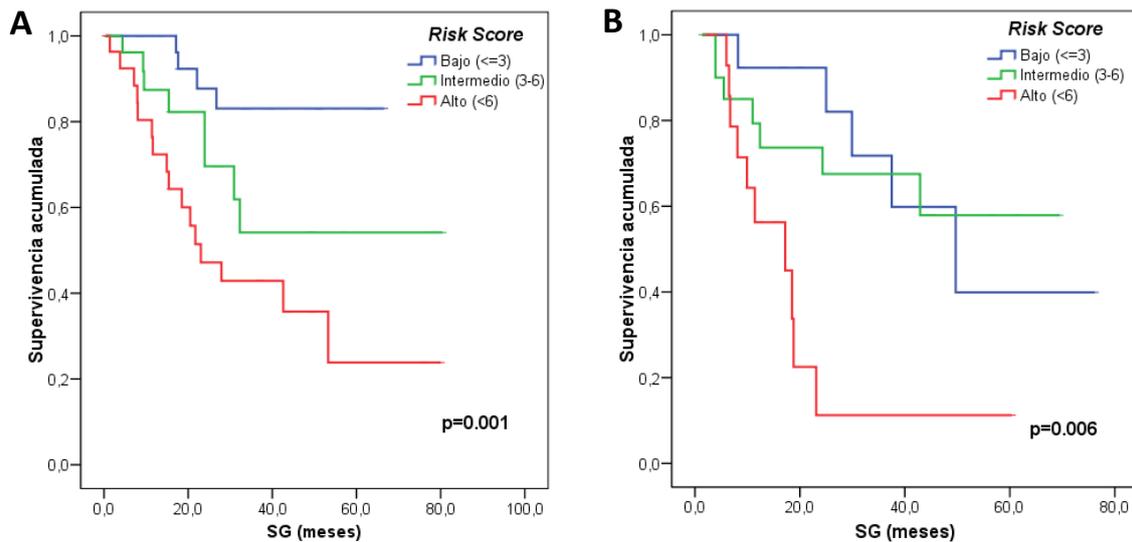
**Figura 39.** Gráficos de *Kaplan-Meier* de TLP y SG en función del *Risk Score*. La línea roja representa los casos con riesgo alto, la línea verde representa los casos con riesgo intermedio y la línea azul representa los casos con riesgo bajo.

Los pacientes clasificados en el grupo de bajo riesgo presentaron un pronóstico más favorable que los del grupo de riesgo intermedio, y estos a su vez, mejor pronóstico que el grupo de riesgo alto, tanto para TLP (NA vs. NA vs. 12.7 meses, respectivamente) como para la SG (NA vs. NA vs. 18.8 meses, respectivamente). Por tanto, la firma genética generada a partir los marcadores angiogénicos que mostraron mayor relevancia pronóstica, resultó ser un óptimo clasificador para estratificar a los pacientes con CPNM en estadios resecables en grupos de riesgo que podrían predecir la probabilidad de recurrencia o muerte tras la cirugía para estos pacientes (Sanmartín *et al.*, 2012). Además, tal y como muestra la Tabla 28, los grupos de riesgo clasificados según la firma genética no presentaban diferencias en las frecuencias de los tipos histológicos, estadios, ECOG-PS, sexo, hábito tabáquico o rango de edad, sugiriendo que las diferencias encontradas en TLP y SG para los tres grupos de riesgo se debían a la clasificación en función del *Risk score* y no estaban influenciadas por las características clínico-patológicas de los pacientes. También se observó que el valor pronóstico del *Risk Score* se mantenía aún cuando se analizaban los pacientes en dos grupos en función del tratamiento adyuvante (pacientes no tratados y pacientes tratados con quimioterapia adyuvante o quimio/radioterapia) (Figura 40). Por tanto, el *Risk Score* se comporta de manera independiente del tratamiento que los pacientes reciben tras la operación. La relevancia de todos estos hallazgos, pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios de validación, los cuales están previstos con una cohorte independiente.

**Tabla 28.** Características de los pacientes en función del grupo de riesgo según la firma genética

Características de los pacientes	Riesgo Bajo		Riesgo Intermedio		Riesgo Alto		p <sup>a</sup>
	No.	%	No.	%	No.	%	
<b>Total</b>	52	100	53	100	49	100	
<b>Edad</b>							
Mediana	61		62		66		0.108
Rango	26-78		37-82		43-85		
<b>Sexo</b>							
Hombre	44	84.6	47	88.7	45	91.8	0.526
Mujer	8	15.4	6	11.3	4	8.2	
<b>ECOG-PS</b>							
0	42	80.8	38	71.7	33	67.3	0.365
1	10	19.2	14	26.4	16	32.6	
2	0	0	1	1.9	0	0	
<b>Histología</b>							
Epidermoide	24	46.1	24	45.3	28	57.1	0.765
Adenocarcinoma	21	40.4	21	39.6	15	30.6	
Otros	7	13.5	8	15.1	6	12.3	
<b>Estadío</b>							
I	28	53.8	22	41.5	27	55.2	0.649
II	13	25.0	17	32.1	11	22.4	
IIIA	11	21.2	14	26.4	11	22.4	
<b>Hábito tabáquico</b>							
Fumador activo	29	55.8	22	41.5	22	44.9	0.499
Exfumador	20	38.4	24	45.3	23	46.9	
No fumador	3	5.8	7	13.2	4	8.2	

<sup>a</sup>p calculada mediante la prueba de Mann Whitney en el caso de la edad, y mediante la prueba de  $\chi^2$  en el caso de las otras variables no continuas.



**Figura 40.** Gráficos de Kaplan-Meier para la SG en función del Risk Score en (A) pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante y (B) pacientes que recibieron tratamiento adyuvante. La línea roja representa los casos con riesgo alto, la línea verde representa los casos con riesgo intermedio y la línea azul representa los casos con riesgo bajo.

Otros autores han analizado también la relevancia de la vía de señalización de VEGF en cáncer de pulmón y han generado un sistema de puntuación o *score* para intentar clasificar a los pacientes en grupos de riesgo, encontrando resultados destacables. El *score* propuesto por Agnagnostou y colaboradores considera la expresión de VEGF-C y VEGFR-3 junto con la estadificación de los pacientes para desarrollar una clasificación ponderada en grupos de riesgo (Agnagnostou *et al.*, 2011). Por otra parte, Pajares y colaboradores plantearon un *score* combinando la expresión de VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR2 que tendría utilidad para distinguir el pronóstico de los pacientes solo cuando presenten histología epidermoide, ya que no observaron asociación con el pronóstico en los pacientes de histología adenocarcinoma (Pajares *et al.*, 2012). Las principales diferencias de estos dos estudios con los resultados presentados en el presente trabajo, son que los grupos de riesgo fueron clasificados basándose en un *score* creado según los niveles proteicos de varios marcadores de la familia de VEGF analizados mediante inmunohistoquímica, y que en sus análisis no incluyeron a todos los miembros de la familia de VEGF, habiendo podido dejar de incorporar a las combinaciones algún marcador con relevancia pronóstica como podrían ser VEGF-B o PIGF.

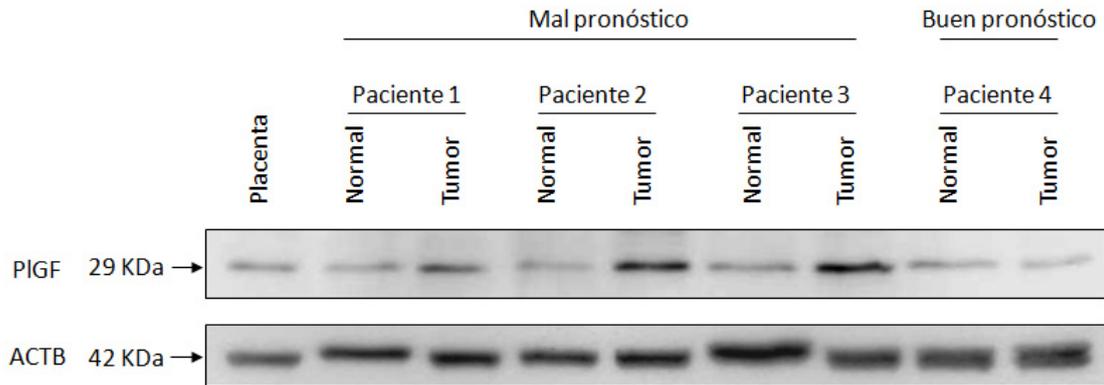
## **2.8. Análisis de proteínas mediante Inmunoblot**

El estudio de la expresión proteica de marcadores angiogénicos y linfangiogénicos en el tejido sano y canceroso de los pacientes se realizó mediante Western blot en un total de 15 parejas de muestras (tejido tumoral y tejido sano). Para este análisis se seleccionaron anticuerpos primarios frente a VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D y PIGF, ya que fueron los marcadores que mostraron resultados más significativos en los análisis de expresión génica.

Mediante el análisis por Western blot no fue posible detectar las proteínas VEGF-B y VEGF-D con los anticuerpos seleccionados en las muestras analizadas, posiblemente debido a su baja expresión. Por otro lado, VEGF-A y PIGF sí fueron detectados mediante este análisis.

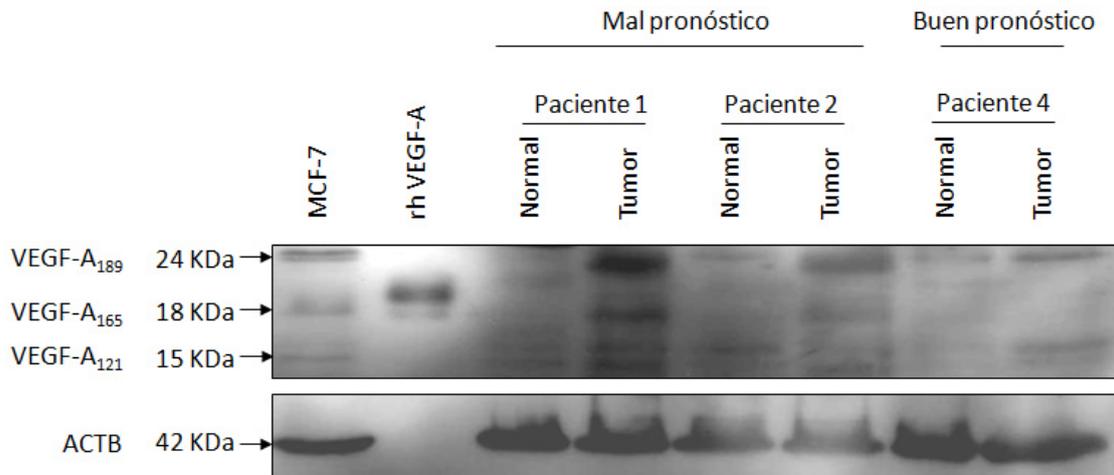
En el caso de PIGF, se detectó una banda específica a 29 KDa, tanto en el control positivo (tejido placentario humano) como en las muestras provenientes de pacientes.

Se observó que los pacientes pertenecientes al grupo de mal pronóstico, según el análisis de expresión relativa realizado previamente (alta expresión génica de PIGF), presentaban mayor expresión proteica en las muestras tumorales que en las normales; mientras que las diferencias no fueron apreciables en los pacientes pertenecientes al grupo de buen pronóstico (ver Figura 41).



**Figura 41.** Análisis de Western blot que muestra la expresión proteica de PIGF en tejido tumoral y normal en pacientes con CPNM. Se muestra la expresión de ACTB como control endógeno. El tejido de placenta humana se empleó como control positivo.

En el caso de VEGF-A, se detectaron 3 bandas de aproximadamente 24, 18 y 15 KDa, correspondientes a las isoformas predominantes, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> y VEGF-A<sub>121</sub>. Los tamaños de las bandas encontradas fueron similares a los esperados y reportados por otros autores para las isoformas de VEGF-A (Cressey *et al.*, 2005; Pajares *et al.*, 2012). En este análisis se emplearon como controles positivos, la proteína recombinante humana para VEGF-A<sub>165</sub> (rhVEGF-A) y la línea celular MCF-7, que expresa las 3 isoformas mencionadas. También en este caso, la expresión proteica de las isoformas de VEGF-A fue mayor en el tejido tumoral que en el tejido sano en los pacientes clasificados en el grupo de mal pronóstico en los análisis de expresión génica (alta expresión de VEGF-A); mientras que las diferencias no fueron tan marcadas en los pacientes del grupo de buen pronóstico (ver Figura 42).



**Figura 42.** Análisis de Western blot que muestra el patrón de expresión de las principales isoformas de VEGF-A en tejido tumoral y normal en pacientes con CPNM. Se muestra la expresión de ACTB como control endógeno. MCF-7 y rhVEGF-A se emplearon como controles positivos.

Existen muy pocos trabajos en la literatura que estudien mediante esta técnica los niveles proteicos de los miembros de la familia de VEGF. Uno de ellos es el de Cressey y colaboradores en el que compararon la expresión de VEGF-A en parejas de muestras tumorales y normales en cáncer de pulmón y en cáncer colorrectal. Según sus resultados, detectaron también las tres isoformas predominantes de VEGF-A (VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> y VEGF-A<sub>121</sub>), encontrando que la isoforma VEGF-A<sub>121</sub> aparecía mas expresada en tejido normal, mientras que las isoformas VEGF-A<sub>165</sub> y VEGF-A<sub>189</sub> se expresaban en mayores niveles en el tejido tumoral de pulmón (Cressey *et al.*, 2005). Sin embargo, en el presente trabajo no se observaron tales diferencias, ya que las tres isoformas de VEGF-A aparecían mayormente expresadas en el tejido tumoral.

Por tanto, se podría concluir que el análisis de Western blot mostró concordancia con los análisis de expresión génica para VEGF-A y PlGF, ya que la expresión más alta de mRNA de estos dos marcadores, que determinaba un peor pronóstico de los pacientes, se encontraba reflejada también en los mayores niveles proteicos en tejido tumoral con respecto al tejido normal. Las diferencias no fueron apreciables para los pacientes con buen pronóstico, siendo en estos casos los niveles tanto de mRNA como de proteínas inferiores.

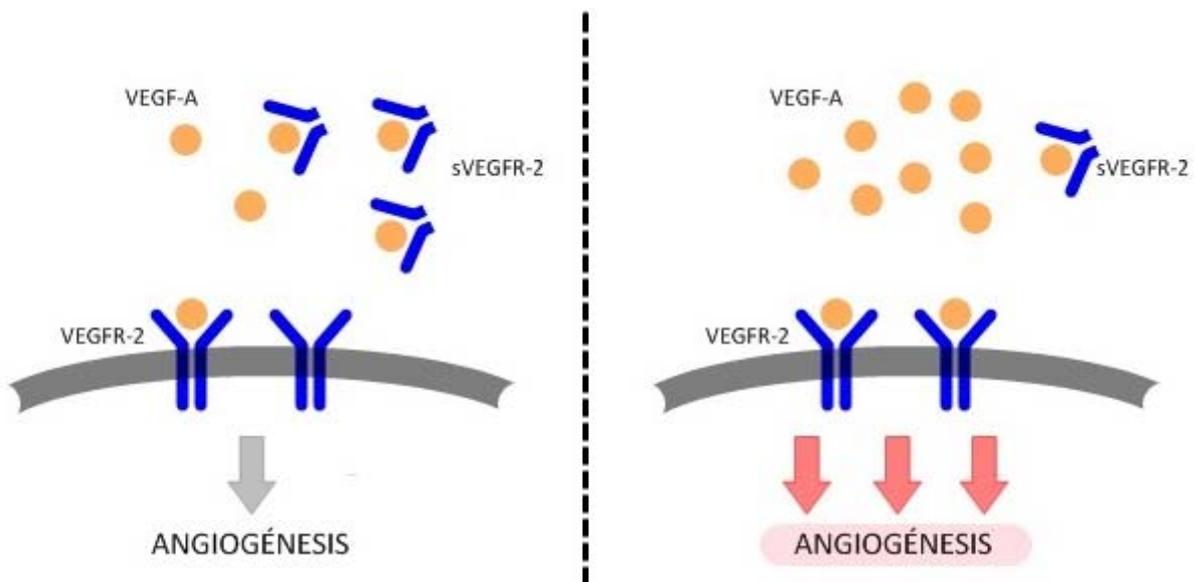
### 3. Integración de resultados

Los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis son eventos tempranos en la enfermedad cancerosa, resultando factores claves en el crecimiento y diseminación tumoral. Es por ello, que se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de los componentes de la principal vía de señalización angiogénica, la del VEGF, tanto a nivel de ligandos como receptores, que han mostrado su eficiencia para contribuir a la regresión tumoral en modelos animales y también en diferentes tumores humanos, incluido en cáncer de pulmón (Ferrara *et al.*, 2003; Hanrahan *et al.*, 2009; Sandler *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de disponer de terapias biológicas específicas, en el cáncer de pulmón, a diferencia de lo que ocurre con otros tumores sólidos, seguimos encontrando unas cifras considerables de recidiva, incluso en pacientes en estadios tempranos. Este hecho hace necesaria la investigación de nuevos biomarcadores pronósticos que permitan detectar a aquellos pacientes que, pese a encontrarse en estadios iniciales y haberse sometidos a una resección quirúrgica completa, o que han sido diagnosticados de un cáncer de pulmón avanzado, presentarán un peor curso clínico de su enfermedad con recidivas precoces y/o mayor riesgo de muerte. De esta manera, la identificación de grupos de pacientes con mal pronóstico podría ayudar a plantear nuevas estrategias de tratamiento multimodal y mejorar los resultados en términos de supervivencia.

En este trabajo se analizó de qué manera la expresión de marcadores angiogénicos y linfangiogénicos, bien de forma individual o como perfiles de expresión o firmas, se encontraba asociada con las características clínico-patológicas de los pacientes con CPNM, con el fin de evaluar su utilidad como biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico en esta patología. Para ello se llevaron a cabo dos estudios en paralelo: el estudio de marcadores solubles y el estudio de marcadores tisulares.

El estudio de los marcadores solubles fue llevado a cabo mediante el análisis de dos marcadores angiogénicos (VEGF-A y sVEGFR-2) en el plasma sanguíneo de pacientes con CPNM en estadios avanzados y en estadios resecables, así como en controles sanos. Nuestros resultados mostraron que los dos marcadores presentaban mayores concentraciones plasmáticas en pacientes que en controles. Además evidenciaron que

VEGF-A permitía una mejor discriminación que sVEGFR-2 entre ambos grupos, sugiriendo una posible utilidad diagnóstica, dada su adecuada especificidad y sensibilidad. A ello se suma que el procedimiento analítico es mínimamente invasivo, precisa poca muestra y resulta barato y rápido. De acuerdo con los datos obtenidos, el valor de corte de VEGF-A en plasma para identificar a sujetos con CPNM en estadio inicial sería de 24.2 pg/ml, mientras que para identificar a pacientes que se encuentren ya en estadio avanzado sería de 37.5 pg/ml. Asimismo, el estudio de los marcadores angiogénicos solubles también demostró que la determinación de los niveles circulantes de VEGF-A y sVEGFR-2 podría ser una herramienta pronóstica para el caso de los pacientes con CPNM en estadios avanzados, en tanto la información pronóstica que aportan en pacientes con CPNM en estadios iniciales es más limitada. Estos análisis permitieron identificar un grupo de pacientes con CPNM avanzado definido por la combinación de altos niveles de VEGF-A y bajos niveles de sVEGFR-2 que exhibían un peor pronóstico. Nuestros resultados sugirieron que el peor pronóstico en este grupo de pacientes se debía al efecto de captura (“tamponador o amortiguador”) que tiene sVEGFR-2 sobre VEGF-A, por tanto, en los pacientes con altos niveles de VEGF-A y menores niveles de sVEGFR-2, habría más VEGF-A disponible para estimular y movilizar a las células hematopoyéticas y progenitores endoteliales (Figura 43).

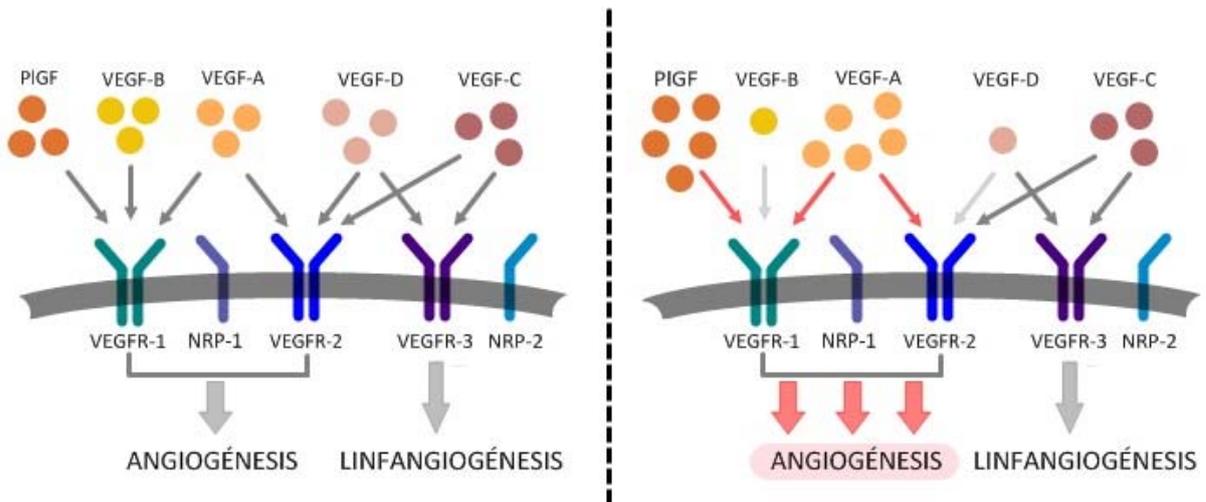


**Figura 43.** Representación esquemática de la interacción de VEGF-A con el receptor VEGFR-2 en la superficie del endotelio vascular y con el receptor soluble sVEGFR-2. A la derecha se muestra la situación que determinaría el peor pronóstico para los pacientes con CPNM avanzado, en la que se encuentran en circulación, niveles más elevados del ligando VEGF-A junto con niveles más bajos de sVEGFR-2.

Por otra parte, el estudio de los marcadores a nivel tisular se realizó en muestras de pacientes con CPNM resecable. Se analizó por primera vez la expresión mediante RTqPCR de todos los miembros de la familia de VEGF, y se incluyeron también las NRPs y HIF1-A, para lograr así una imagen más completa de las interrelaciones entre los factores angio- y linfangiogénicos en CPNM. La RTqPCR presenta una serie de ventajas, tales como su especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, y que comparada con otras metodologías como la IHQ no comporta criterios de variabilidad inter-observador. Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto la relevancia de la vía de señalización de VEGF en el pronóstico de los pacientes con CPNM resecable. La alta expresión de VEGF-A o PlGF, así como la baja expresión de VEGF-B o VEGF-D resultaron ser factores de pronóstico negativo para los pacientes. La combinación de estos factores mostró mayor significación estadística que el análisis de los marcadores de forma individual, siendo la variable angiogénica combinada un factor pronóstico independiente. Los hallazgos de este estudio sugieren que VEGF-A y PlGF son importantes mediadores en el proceso angiogénico; mientras que VEGF-B y VEGF-D podrían actuar como agonistas competitivos, posiblemente con menor acción angiogénica o incluso como antagonistas o inhibidores de VEGF-A y PlGF, ya que se unen a los mismos receptores (VEGFR-1 y VEGFR-2, respectivamente). Por tanto, cuando se combinan, los bajos niveles de VEGF-B y/o VEGF-D con altos niveles de VEGF-A y/o PlGF se produce una activación angiogénica mayor y por consiguiente, los pacientes presentan un pronóstico más desfavorable (Figura 44). Si bien es cierto que estas hipótesis sobre la funcionalidad de los distintos ligandos del VEGF necesitaría de un estudio más detallado de su repercusión celular.

Con el objetivo de lograr una mejor estratificación de los pacientes con CPNM en estadios iniciales, desarrollamos un modelo matemático para la generación de un índice de riesgo (*Risk Score*) basado en los datos de los niveles de expresión de PlGF, VEGF-A y VEGF-B, que permitió de manera significativa agrupar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo y que, tras su validación en otras cohortes, podría ser considerado en estudios clínicos como biomarcador para la selección de pacientes. Como se ha mencionado anteriormente, el actual sistema de estadificación basado en las características tumorales falla en la selección de pacientes con mayor riesgo de

recurrencia o muerte tras la cirugía, sobre todo en los estadios iniciales de la enfermedad. La utilización de este *Risk Score* permitiría mejorar la caracterización de los pacientes en estadios tempranos, resultando especialmente útil, ya que se trata de un grupo heterogéneo en términos de supervivencia. De esta forma, al categorizar a los pacientes en grupos de riesgo, se podrían identificar a aquellos pacientes candidatos a recibir terapias de inducción o tratamiento adyuvante. Otro aspecto a favor del empleo de este indicador como herramienta accesible para la práctica clínica, es que en muchos aspectos reúne los criterios de un buen biomarcador, ya que el procedimiento analítico requiere poca muestra, se puede establecer un método rutinario y automatizado de análisis que consume poco tiempo, es barato, altamente reproducible y no subjetivo.



**Figura 44.** Representación esquemática de las interacciones entre ligandos y receptores de la familia de VEGF. A la derecha se muestra la situación que determinaría el peor pronóstico para los pacientes en estadios resecables, donde VEGF-A y PIGF se encuentran en niveles elevados, mientras que VEGF-B y VEGF-D se encuentran en niveles bajos. Las bolas son una representación cuantitativa para simbolizar la competencia de los ligandos por la unión a los receptores.

En resumen, tanto los análisis de marcadores solubles como tisulares, indicaron que la mejor vía para abordar el estudio de factores angiogénicos y/o linfangiogénicos sería el estudio de los perfiles de expresión de marcadores combinados o firmas genéticas, ya que aportan más información acerca de la compleja interacción de estos factores en la regulación de dichos mecanismos. Esta aproximación podría representar un complemento a la labor clínica habitual que permitiría una mejor caracterización de aquellos pacientes con un perfil molecular más angiogénico, que podrían ser

candidatos a terapias dirigidas, en lo que hoy día se conoce como medicina personalizada. Igualmente, posibilitaría diferenciar a aquellos pacientes con bajo riesgo, que no requerirían tales terapias por resultarles menos beneficiosas, y se evitarían así los posibles efectos negativos. Para ello sin embargo, serán todavía necesarios más estudios y ensayos clínicos en cohortes prospectivas que evalúen el potencial de estos biomarcadores en relación a los nuevos fármacos.

#### **IV. CONCLUSIONES FINALES**



1. El análisis de marcadores angiogénicos en sangre periférica demostró que los niveles plasmáticos de VEGF-A y sVEGFR2 son significativamente superiores en pacientes con CPNM en relación a los sujetos sanos, y que dado el adecuado nivel de especificidad y sensibilidad de la determinación de VEGF-A, podría ser una herramienta más de apoyo al diagnóstico del CPNM.
2. Los análisis del valor pronóstico de estos biomarcadores plasmáticos revelaron que un perfil formado por la combinación de niveles altos de VEGF-A y niveles bajos de sVEGFR-2 circulantes permite identificar a un subgrupo de pacientes con CPNM avanzado que presentan un curso clínico más desfavorable.
3. El estudio de expresión de los genes angio/linfoangiogénicos analizados en muestras tisulares de pacientes con CPNM resecable mostró que el gen PIGF se encuentra sobreexpresado y los genes VEGFR-2, VEGFR-3 y VEGF-D se encuentran infraexpresados en tejido tumoral, respecto al tejido pulmonar normal.
4. El análisis de las correlaciones entre los niveles de expresión génica tisular y las características clínico-patológicas de los pacientes pone de manifiesto que la sobreexpresión de PIGF es mayor en pacientes de histología epidermoide; mientras que la infraexpresión de VEGF-D se relaciona con la edad avanzada, el estadio y la metástasis de nódulos linfáticos.
5. Los análisis de supervivencia para los marcadores tisulares revelaron que los niveles elevados a nivel de mRNA de VEGF-A o PIGF, así como los niveles bajos de VEGF-B o VEGF-D se relacionan con un peor pronóstico de los pacientes con CPNM resecable.
6. Los análisis de expresión proteica tisular mediante Wester blot mostraron concordancia con los análisis de expresión génica para VEGF-A y PIGF, puesto que los pacientes con peor pronóstico reflejan mayores niveles proteicos de estos dos marcadores en el tejido tumoral con respecto al tejido normal.

- 7.** Las combinaciones de PIGF, VEGF-A, VEGF-B y VEGF-D se correlacionan con el pronóstico de los pacientes con mayor poder estadístico que las variables de forma individual, poniendo de manifiesto la utilidad de los perfiles de expresión de marcadores combinados para una mejor caracterización de los pacientes.
- 8.** La firma genética generada en función de los niveles de expresión de PIGF, VEGF-A y VEGF-B mostró ser una apropiada herramienta para la clasificación de los pacientes con CPNM resecable en grupos de riesgo, que proporcionaría información valiosa para el manejo terapéutico de estos pacientes.

## V. BIBLIOGRAFÍA



- Aberle,D.R., Adams,A.M., Berg,C.D., Black,W.C., Clapp,J.D., Fagerstrom,R.M., Gareen,I.F., Gatsonis,C., Marcus,P.M., and Sicks,J.D. (2011). Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N. Engl. J. Med.* **365**, 395-409.
- Aguayo,A., Kantarjian,H.M., Estey,E.H., Giles,F.J., Verstovsek,S., Manshouri,T., Gidel,C., O'Brien,S., Keating,M.J., and Albitar,M. (2002). Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer* **95**, 1923-1930.
- Ahn,G.O. and Brown,J.M. (2009). Role of endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of the tumor vasculature. *Angiogenesis.* **12**, 159-164.
- Al-Moundhri,M.S., Al-Shukaili,A., Al-Nabhani,M., Al-Bahrani,B., Burney,I.A., Rizivi,A., and Ganguly,S.S. (2008). Measurement of circulating levels of VEGF-A, -C, and -D and their receptors, VEGFR-1 and -2 in gastric adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* **14**, 3879-3883.
- Albuquerque,R.J., Hayashi,T., Cho,W.G., Kleinman,M.E., Dridi,S., Takeda,A. *et al.* (2009). Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat. Med.* **15**, 1023-1030.
- Anagnostou,V.K., Tiniakos,D.G., Fotinou,M., Achimastos,A., and Syrigos,K.N. (2011). Multiplexed analysis of angiogenesis and lymphangiogenesis factors predicts outcome for non-small cell lung cancer patients. *Virchows Arch.* **458**, 331-340.
- Angulo,B., Suarez-Gauthier,A., Lopez-Rios,F., Medina,P.P., Conde,E., Tang,M., Soler,G., Lopez-Encuentra,A., Cigudosa,J.C., and Sanchez-Cespedes,M. (2008). Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J. Pathol.* **214**, 347-356.
- Atkinson,A.J., Colburn,W.A., DeGruttola,V.G., Demets,D.L., Downing,G.J., Hoth,D.F. *et al.* (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89-95.
- Baillie,R., Carlile,J., Pendleton,N., and Schor,A.M. (2001). Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *J. Clin. Pathol.* **54**, 116-120.
- Banks,R.E., Forbes,M.A., Kinsey,S.E., Stanley,A., Ingham,E., Walters,C., and Selby,P.J. (1998). Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br. J. Cancer* **77**, 956-964.
- Bar,J. and Goss,G.D. (2012). Tumor vasculature as a therapeutic target in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 609-620.

- Bates,D.O., Cui,T.G., Doughty,J.M., Winkler,M., Sugiono,M., Shields,J.D., Peat,D., Gillatt,D., and Harper,S.J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 62, 4123-4131.
- Bergers,G. and Benjamin,L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401-410.
- Bikfalvi,A. (2007). Angiogenesis: molecular mechanisms of activation, promotion and maintenance. *J. BUON.* 12 *Suppl 1*, S59-S66.
- Bilello,K.S., Murin,S., and Matthay,R.A. (2002). Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin. Chest Med.* 23, 1-25.
- Bland,J.M. and Altman,D.G. (1995). Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310, 170.
- Bo,C., Xiaopeng,D., Chuanliang,P., and Xiaogang,Z. (2009). Expression of vascular endothelial growth factors C and D correlates with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 57, 291-294.
- Bocci,G., Man,S., Green,S.K., Francia,G., Ebos,J.M., du Manoir,J.M. *et al.* (2004). Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 64, 6616-6625.
- Brattstrom,D., Bergqvist,M., Hesselius,P., Larsson,A., Lamberg,K., Wernlund,J., Brodin,O., and Wagenius,G. (2002). Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary tumours and poorer survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 37, 57-63.
- Brattstrom,D., Bergqvist,M., Hesselius,P., Larsson,A., Wagenius,G., and Brodin,O. (2004). Serum VEGF and bFGF adds prognostic information in patients with normal platelet counts when sampled before, during and after treatment for locally advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 43, 55-62.
- Bremnes,R.M., Camps,C., and Sirera,R. (2006). Angiogenesis in non-small cell lung cancer: The prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 51, 143-158.
- Camps,C., Jantus-Lewintre,E., Cabrera,A., Blasco,A., Sanmartin,E., Gallach,S. *et al.* (2011). The identification of KRAS mutations at codon 12 in plasma DNA is not a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 72, 365-369.
- Cao,Y. (2009). Linfangiogenesis y Metástasis Linfática. In: *Angiogenesis y Cáncer*, ed. E.Alba and A.Rodriguez-Quesada. Barcelona: TACTICS MD, 71-94.
- Carmeliet,P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

- Carrillo de Santa,P.E., Arias,F.C., Caso,P.E., Munoz Molina,G.M., Sanchez,H., I, Muguruza,T., I, Moreno,B.R., Sacristan,L.S., Gomez,P.A., and Val Toledo,L.M. (2009). Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their receptors R1, R2, and R3 in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 115, 1701-1712.
- Catena,R., Larzabal,L., Larrayoz,M., Molina,E., Hermida,J., Agorreta,J., Montes,R., Pio,R., Montuenga,L.M., and Calvo,A. (2010). VEGFb and VEGFb are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol. Cancer* 9, 320.
- Chakra,M., Pujol,J.L., Lamy,P.J., Bozonnat,M.C., Quantin,X., Jacot,W., and Daures,J.P. (2008). Circulating serum vascular endothelial growth factor is not a prognostic factor of non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol* 3, 1119-1126.
- Chang,Y.T., Chang,M.C., Wei,S.C., Tien,Y.W., Hsu,C., Liang,P.C., Tsao,P.N., Jan,I.S., and Wong,J.M. (2008). Serum vascular endothelial growth factor/soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 ratio is an independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Pancreas* 37, 145-150.
- Charoenrat,P., Rhys-Evans,P., and Eccles,S.A. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 92, 556-568.
- Chen,C.N., Hsieh,F.J., Cheng,Y.M., Cheng,W.F., Su,Y.N., Chang,K.J., and Lee,P.H. (2004). The significance of placenta growth factor in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *Cancer Lett.* 213, 73-82.
- Cheng,S.J., Lee,J.J., Kok,S.H., Chou,C.H., Chang,H.H., Chiang,M.L., Chen,H.M., Kuo,M.Y., and Chiang,C.P. (2010). Expression of placenta growth factor: an independent factor for prediction of progression and prognosis of oral cancer. *Head Neck* 32, 1363-1369.
- Choi,J.H., Kim,H.C., Lim,H.Y., Nam,D.K., Kim,H.S., Yi,J.W. *et al.* (2001). Vascular endothelial growth factor in the serum of patients with non-small cell lung cancer: correlation with platelet and leukocyte counts. *Lung Cancer* 33, 171-179.
- Coate,L.E., John,T., Tsao,M.S., and Shepherd,F.A. (2009). Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 10, 1001-1010.
- Connolly,D.T., Olander,J.V., Heuvelman,D., Nelson,R., Monsell,R., Siegel,N., Haymore,B.L., Leimgruber,R., and Feder,J. (1989). Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 20017-20024.
- Cressey,R., Wattananupong,O., Lertprasertsuke,N., and Vinitketkumnuen,U. (2005). Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumourigenesis. *BMC. Cancer* 5, 128.
- Dacic,S. (2011). Molecular diagnostics of lung carcinomas. *Arch. Pathol. Lab Med.* 135, 622-629.

- Dadras,S.S., Lange-Asschenfeldt,B., Velasco,P., Nguyen,L., Vora,A., Muzikansky,A. *et al.* (2005). Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod. Pathol.* *18*, 1232-1242.
- Das,K., Zhao,Y., Sugiono,M., Lau,W., Tan,P.H., and Cheng,C. (2007). Differential expression of vascular endothelial growth factor165b in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol. Oncol.* *25*, 317-321.
- DeLong,E.R., DeLong,D.M., and Clarke-Pearson,D.L. (1988). Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* *44*, 837-845.
- Detterbeck,F.C., Boffa,D.J., and Tanoue,L.T. (2009). The new lung cancer staging system. *Chest* *136*, 260-271.
- Ding,S., Lin,S., Dong,X., Yang,X., Qu,H., Huang,S., Liu,W., Zhou,L., and Liu,D. (2005). Potential prognostic value of circulating levels of vascular endothelial growth factor-A in patients with gastric cancer. *In Vivo* *19*, 793-795.
- Donnem,T., Al-Shibli,K., Andersen,S., Al-Saad,S., Busund,L.T., and Bremnes,R.M. (2010). Combination of low vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)/VEGF receptor 2 expression and high lymphocyte infiltration is a strong and independent favorable prognostic factor in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* *116*, 4318-4325.
- Dosoretz,D.E., Katin,M.J., Blitzer,P.H., Rubenstein,J.H., Salenius,S., Rashid,M. *et al.* (1992). Radiation therapy in the management of medically inoperable carcinoma of the lung: results and implications for future treatment strategies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *24*, 3-9.
- Dror,M.M., Regan,M.M., Oh,W.K., Kaufman,D.S., Olivier,K., Michaelson,S.Z., Spicer,B., Gurski,C., Kantoff,P.W., and Smith,M.R. (2009). Phase II study of sunitinib in men with advanced prostate cancer. *Ann. Oncol* *20*, 913-920.
- Dunst,J., Stadler,P., Becker,A., Kuhnt,T., Lautenschlager,C., Molls,M., and Haensgen,G. (2001). Tumor hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck cancers. *Strahlenther. Onkol.* *177*, 469-473.
- Dvorak,H.F. (2005). Angiogenesis: update 2005. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 1835-1842.
- Ebbert,J.O., Yang,P., Vachon,C.M., Vierkant,R.A., Cerhan,J.R., Folsom,A.R., and Sellers,T.A. (2003). Lung cancer risk reduction after smoking cessation: observations from a prospective cohort of women. *J. Clin. Oncol.* *21*, 921-926.
- Ebos,J.M., Bocci,G., Man,S., Thorpe,P.E., Hicklin,D.J., Zhou,D., Jia,X., and Kerbel,R.S. (2004). A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol. Cancer Res.* *2*, 315-326.
- Ebos,J.M., Lee,C.R., Bogdanovic,E., Alami,J., Van Slyke,P., Francia,G., Xu,P., Mutsaers,A.J., Dumont,D.J., and Kerbel,R.S. (2008). Vascular endothelial growth factor-

mediated decrease in plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 levels as a surrogate biomarker for tumor growth. *Cancer Res.* 68, 521-529.

Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O. *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043.

Feng, Y., Wang, W., Hu, J., Ma, J., Zhang, Y., and Zhang, J. (2010). Expression of VEGF-C and VEGF-D as significant markers for assessment of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Anat. Rec. (Hoboken.)* 293, 802-812.

Ferlay, J., Parkin, D.M., and Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur. J. Cancer* 46, 765-781.

Ferrara, N. (2004a). Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 9 Suppl 1, 2-10.

Ferrara, N. (2004b). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25, 581-611.

Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669-676.

Ferrara, N. and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-858.

Folkman, J. (1971b). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.

Folkman, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* 3, 643-651.

Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. (1971a). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 133, 275-288.

Freedman, N.D., Leitzmann, M.F., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., and Abnet, C.C. (2008). Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. *Lancet Oncol.* 9, 649-656.

George, M.L., Tutton, M.G., Janssen, F., Arnaout, A., Abulafi, A.M., Eccles, S.A., and Swift, R.I. (2001). VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia.* 3, 420-427.

Ghosal, R., Kloer, P., and Lewis, K.E. (2009). A review of novel biological tools used in screening for the early detection of lung cancer. *Postgrad. Med. J.* 85, 358-363.

Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D.J., Groome, P.A., Rami-Porta, R., Postmus, P.E., Rusch, V., and Sobin, L. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project:

proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J. Thorac. Oncol.* **2**, 706-714.

Gora-Tybor, J., Blonski, J.Z., and Robak, T. (2005). Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur. Cytokine Netw.* **16**, 41-46.

Gorlova, O.Y., Zhang, Y., Schabath, M.B., Lei, L., Zhang, Q., Amos, C.I., and Spitz, M.R. (2006). Never smokers and lung cancer risk: a case-control study of epidemiological factors. *Int. J. Cancer* **118**, 1798-1804.

Greene, F.L., Page D.L, Fleming I.D, Fritz A.G, Balch C.M, Haller D.G, and Morrow M (2002). *AJCC Cancer Staging Manual 6th Ed*, New York: Springer.

Gupta, M.K. and Qin, R.Y. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* **9**, 1144-1155.

Hackshaw, A.K., Law, M.R., and Wald, N.J. (1997). The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* **315**, 980-988.

Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 331-341.

Hamano, Y. and Kalluri, R. (2005). Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 292-298.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.

Hanash, S.M., Baik, C.S., and Kallioniemi, O. (2011). Emerging molecular biomarkers--blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 142-150.

Hanley, J.A. and McNeil, B.J. (1982). The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* **143**, 29-36.

Hanrahan, E.O., Lin, H.Y., Kim, E.S., Yan, S., Du, D.Z., McKee, K.S. *et al.* (2010). Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol* **28**, 193-201.

Hanrahan, E.O., Ryan, A.J., Mann, H., Kennedy, S.J., Langmuir, P., Natale, R.B., Herbst, R.S., Johnson, B.E., and Heymach, J.V. (2009). Baseline vascular endothelial growth factor concentration as a potential predictive marker of benefit from vandetanib in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3600-3609.

Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc.)* **62**, 1180-1190.

Henschke,C.I., Yankelevitz,D.F., and Altorki,N.K. (2007). The role of CT screening for lung cancer. *Thorac. Surg. Clin.* *17*, 137-142.

Henschke,C.I., Yankelevitz,D.F., Libby,D.M., Pasmantier,M.W., Smith,J.P., and Miettinen,O.S. (2006). Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N. Engl. J. Med.* *355*, 1763-1771.

Hicklin,D.J. and Ellis,L.M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* *23*, 1011-1027.

Hilmi,C., Guyot,M., and Pages,G. (2012). VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J. Nucleic Acids* *2012*, 162692.

Hirayama,T. (2000). Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. 1981. *Bull. World Health Organ* *78*, 940-942.

Hirsch,F.R., Wynes,M.W., Gandara,D.R., and Bunn,P.A., Jr. (2010). The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* *16*, 4909-4911.

Hornbrey,E., Gillespie,P., Turner,K., Han,C., Roberts,A., McGrouther,D., and Harris,A.L. (2002). A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clin. Exp. Metastasis* *19*, 651-663.

Horn,L. and Pao,W. (2009). EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* *27*, 4232-4235.

Humphrey,L.L., Teutsch,S., and Johnson,M. (2004). Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* *140*, 740-753.

Ilhan,N., Ilhan,N., and Deveci,F. (2004). Functional significance of vascular endothelial growth factor and its receptor (receptor-1) in various lung cancer types. *Clin. Biochem.* *37*, 840-845.

Imoto,H., Osaki,T., Taga,S., Ohgami,A., Ichiyoshi,Y., and Yasumoto,K. (1998). Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: prognostic significance in squamous cell carcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *115*, 1007-1014.

Jain,R.K., Duda,D.G., Willett,C.G., Sahani,D.V., Zhu,A.X., Loeffler,J.S., Batchelor,T.T., and Sorensen,A.G. (2009). Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *6*, 327-338.

Jantus-Lewintre,E., Sanmartin,E., Sirera,R., Blasco,A., Sanchez,J.J., Taron,M., Rosell,R., and Camps,C. (2011). Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC. *Lung Cancer* *74*, 326-331.

- Jantus-Lewintre,E., Uso,M., Sanmartin,E., and Camps,C. (2012). Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*. 3, 21-29.
- Jayson,G.C., de Haas,S., Delmar,P., Miles,D.W., Shah,M.A., Van Cutsem,E., Carmeliet,P., Hegde,P., Wild,N., and Scherer,S.J. (2011). Evaluation of Plasma VEGFA as a Potential Predictive Pan-tumour Biomarker for Bevacizumab. *Eur. J. Cancer* 47, S96.
- Jelkmann,W. (2001). Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin. Chem.* 47, 617-623.
- Jemal,A., Bray,F., Center,M.M., Ferlay,J., Ward,E., and Forman,D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61, 69-90.
- Jemal,A., Thun,M.J., Ries,L.A., Howe,H.L., Weir,H.K., Center,M.M. *et al.* (2008). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 1672-1694.
- Juttner,S., Wissmann,C., Jons,T., Vieth,M., Hertel,J., Gretschel,S., Schlag,P.M., Kemmner,W., and Hocker,M. (2006). Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 24, 228-240.
- Karayiannakis,A.J., Syrigos,K.N., Polychronidis,A., Zbar,A., Kouraklis,G., Simopoulos,C., and Karatzas,G. (2002). Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann. Surg.* 236, 37-42.
- Kaya,A., Ciledag,A., Gulbay,B.E., Poyraz,B.M., Celik,G., Sen,E., Savas,H., and Savas,I. (2004). The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir. Med.* 98, 632-636.
- Kemik,O., Sumer,A., Kemik,S.A., Purisa,S., and Tuzun,S. (2010). Circulating levels of VEGF family and their receptors in hepatocellular carcinoma. *Bratisl. Lek. Listy* 111, 485-488.
- Kerbel,R.S. (2008). Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 358, 2039-2049.
- Ko,Y.H., Jung,C.K., Lee,M.A., Byun,J.H., Kang,J.H., Lee,K.Y., Jo,K.H., Wang,Y.P., and Hong,Y.S. (2008). Clinical significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res. Treat.* 40, 133-140.
- Kondo,S., Asano,M., Matsuo,K., Ohmori,I., and Suzuki,H. (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim. Biophys. Acta* 1221, 211-214.
- Kou,B., Li,Y., Zhang,L., Zhu,G., Wang,X., Li,Y., Xia,J., and Shi,Y. (2004). In vivo inhibition of tumor angiogenesis by a soluble VEGFR-2 fragment. *Exp. Mol. Pathol.* 76, 129-137.

- Kuhnert,F., Tam,B.Y., Sennino,B., Gray,J.T., Yuan,J., Jocson,A., Nayak,N.R., Mulligan,R.C., McDonald,D.M., and Kuo,C.J. (2008). Soluble receptor-mediated selective inhibition of VEGFR and PDGFRbeta signaling during physiologic and tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 10185-10190.
- Kut,C., Mac,G.F., and Popel,A.S. (2007). Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br. J. Cancer* *97*, 978-985.
- Laack,E., Kohler,A., Kugler,C., Dierlamm,T., Knuffmann,C., Vohwinkel,G. *et al.* (2002). Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* *13*, 1550-1557.
- Ladanyi,M. (2008). Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists. *Mod. Pathol.* *21 Suppl 2*, S1.
- Ladanyi,M. and Pao,W. (2008). Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod. Pathol.* *21 Suppl 2*, S16-S22.
- Lam,W.K. (2005). Lung cancer in Asian women-the environment and genes. *Respirology.* *10*, 408-417.
- Langer,C.J., Besse,B., Gualberto,A., Brambilla,E., and Soria,J.C. (2010). The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* *28*, 5311-5320.
- Li,A.R., Chitale,D., Riely,G.J., Pao,W., Miller,V.A., Zakowski,M.F., Rusch,V., Kris,M.G., and Ladanyi,M. (2008). EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *J. Mol. Diagn.* *10*, 242-248.
- Liao,M., Wang,H., Lin,Z., Feng,J., and Zhu,D. (2001). Vascular endothelial growth factor and other biological predictors related to the postoperative survival rate on non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* *33*, 125-132.
- Lorquet,S., Berndt,S., Blacher,S., Gengoux,E., Peulen,O., Maquoi,E., Noel,A., Foidart,J.M., Munaut,C., and Pequeux,C. (2010). Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. *FASEB J.* *24*, 3782-3795.
- Lynch,T.J., Bell,D.W., Sordella,R., Gurubhagavatula,S., Okimoto,R.A., Brannigan,B.W. *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2129-2139.
- Maae,E., Olsen,D.A., Steffensen,K.D., Jakobsen,E.H., Brandslund,I., Sorensen,F.B., and Jakobsen,A. (2012). Prognostic impact of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor A in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *133*, 257-265.

- Maekawa,S., Iwasaki,A., Shirakusa,T., Enatsu,S., Kawakami,T., Kuroki,M., and Kuroki,M. (2007). Correlation between lymph node metastasis and the expression of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 in T1 lung adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 27, 3735-3741.
- Manetti,M., Guiducci,S., Romano,E., Ceccarelli,C., Bellando-Randone,S., Conforti,M.L., Ibba-Manneschi,L., and Matucci-Cerinic,M. (2011). Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ. Res.* 109, e14-e26.
- Martinez-Ezquerro,J.D. and Herrera,L.A. (2006). Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología* 1, 83-96.
- Matakidou,A., Eisen,T., and Houlston,R.S. (2005). Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br. J. Cancer* 93, 825-833.
- Matsumoto,K., Suzuki,K., Koike,H., Okamura,K., Tsuchiya,K., Uchida,T., Takezawa,Y., Kobayashi,M., and Yamanaka,H. (2003). Prognostic significance of plasma placental growth factor levels in renal cell cancer: an association with clinical characteristics and vascular endothelial growth factor levels. *Anticancer Res.* 23, 4953-4958.
- Mattern,J., Koomagi,R., and Volm,M. (1996). Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br. J. Cancer* 73, 931-934.
- Mattern,J., Koomagi,R., and Volm,M. (1997). Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density. *Anticancer Res.* 17, 2249-2252.
- Miles,D.W., de Haas,S.L., Dirix,L., Chan,A., Pivot,X., Tomczak,P., Provencher,L., Delmar,P., and Scherer,S. (2010). Plasma Biomarker Analyses in the AVADO Phase III Randomized Study of First-Line Bevacizumab + Docetaxel in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER) 2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 70, P2-16-04.
- Moffat,B.A., Chen,M., Kariaapper,M.S., Hamstra,D.A., Hall,D.E., Stojanovska,J. *et al.* (2006). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A causes a paradoxical increase in tumor blood flow and up-regulation of VEGF-D. *Clin. Cancer Res.* 12, 1525-1532.
- Molina,J.R., Yang,P., Cassivi,S.D., Schild,S.E., and Adjei,A.A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* 83, 584-594.
- Molina-Vila,M.A., Bertran-Alamillo,J., Reguart,N., Taron,M., Castella,E., Llatjos,M. *et al.* (2008). A sensitive method for detecting EGFR mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. *J. Thorac. Oncol.* 3, 1224-1235.
- Mylona,E., Alexandrou,P., Giannopoulou,I., Liapis,G., Sofia,M., Keramopoulos,A., and Nakopoulou,L. (2007). The prognostic value of vascular endothelial growth factors

(VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol. Oncol* 104, 557-563.

Mysliwiec,P., Pawlak,K., Bandurski,R., and Kedra,B. (2009). Soluble angiogenesis markers in gastric tumor patients. *Folia Histochem. Cytobiol.* 47, 81-86.

Nagahashi,M., Ramachandran,S., Rashid,O.M., and Takabe,K. (2010). Lymphangiogenesis: a new player in cancer progression. *World J. Gastroenterol.* 16, 4003-4012.

Nagaoka,S., Yoshida,T., Akiyoshi,J., Akiba,J., Hisamoto,T., Yoshida,Y. *et al.* (2010). The ratio of serum placenta growth factor to soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 predicts the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* 23, 1647-1654.

Nakamura,Y., Yasuoka,H., Tsujimoto,M., Yang,Q., Imabun,S., Nakahara,M., Nakao,K., Nakamura,M., Mori,I., and Kakudo,K. (2003). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin. Cancer Res.* 9, 716-721.

Nash,A.D., Baca,M., Wright,C., and Scotney,P.D. (2006). The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm. Pharmacol. Ther.* 19, 61-69.

Neal,J.W. (2010). Histology matters: individualizing treatment in non-small cell lung cancer. *Oncologist.* 15, 3-5.

Niki,T., Iba,S., Tokunou,M., Yamada,T., Matsuno,Y., and Hirohashi,S. (2000). Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 2431-2439.

Nikolinakos,P.G., Altorki,N., Yankelevitz,D., Tran,H.T., Yan,S., Rajagopalan,D., Bordogna,W., Ottesen,L.H., and Heymach,J.V. (2010). Plasma cytokine and angiogenic factor profiling identifies markers associated with tumor shrinkage in early-stage non-small cell lung cancer patients treated with pazopanib. *Cancer Res.* 70, 2171-2179.

Otrock,Z.K., Makarem,J.A., and Shamseddine,A.I. (2007). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol. Dis.* 38, 258-268.

Paez,J.G., Janne,P.A., Lee,J.C., Tracy,S., Greulich,H., Gabriel,S. *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500.

Pajares,M.J., Agorreta,J., Larrayoz,M., Vesin,A., Ezponda,T., Zudaire,I. *et al.* (2012). Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. *J. Clin. Oncol.* 30, 1129-1136.

Pao,W. and Girard,N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 12, 175-180.

- Papetti,M. and Herman,I.M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 282, C947-C970.
- Park,S.H. and Lee,S.S. (2003). The relationship between serum VEGF concentration and prognosis of lung cancer. *Korean J. Intern. Med.* 18, 207-211.
- Parr,C., Watkins,G., Boulton,M., Cai,J., and Jiang,W.G. (2005). Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur. J. Cancer* 41, 2819-2827.
- Pepper,M.S., Tille,J.C., Nisato,R., and Skobe,M. (2003). Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.* 314, 167-177.
- Peto,R., Darby,S., Deo,H., Silcocks,P., Whitley,E., and Doll,R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* 321, 323-329.
- Pfaffl,M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Qian,Q., Zhan,P., Yu,L., Shi,Y., Cheng,J., Wei,S., Wang,Q., and Song,Y. (2011). Baseline levels and decrease in serum soluble intercellular adhesion molecule-1 during chemotherapy predict objective response and survival in patients who have advanced non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer* 12, 131-137.
- Rafii,S., Lyden,D., Benezra,R., Hattori,K., and Heissig,B. (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer* 2, 826-835.
- Ribatti,D. (2008). The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis.* 11, 215-221.
- Rodenhuis,S., Boerrigter,L., Top,B., Slebos,R.J., Mooi,W.J., van't Veer,L., and van Zandwijk,N. (1997). Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study. *J. Clin. Oncol.* 15, 285-291.
- Rodenhuis,S., van de Wetering,M.L., Mooi,W.J., Evers,S.G., van,Z.N., and Bos,J.L. (1987). Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.* 317, 929-935.
- Rosell,R., Carcereny,E., Gervais,R., Vergnenegre,A., Massuti,B., Felip,E. *et al.* (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 13, 239-246.
- Rosell,R., Moran,T., Queralt,C., Porta,R., Cardenal,F., Camps,C. *et al.* (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 958-967.

- Roselli,M., Mineo,T.C., Basili,S., Mariotti,S., Martini,F., Bellotti,A. *et al.* (2003). Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) plasma levels in non-small cell lung cancer: relationship with coagulation and platelet activation markers. *Thromb. Haemost.* **89**, 177-184.
- Roskoski,R., Jr. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **62**, 179-213.
- Rossi,G., Pelosi,G., Graziano,P., Barbareschi,M., and Papotti,M. (2009). A reevaluation of the clinical significance of histological subtyping of non--small-cell lung carcinoma: diagnostic algorithms in the era of personalized treatments. *Int. J. Surg. Pathol.* **17**, 206-218.
- Roy,H., Bhardwaj,S., and Yla-Herttuala,S. (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* **580**, 2879-2887.
- Saijo,N. (2012). Critical comments for roles of biomarkers in the diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 63-67.
- Saintigny,P., Kambouchner,M., Ly,M., Gomes,N., Sainte-Catherine,O., Vassy,R. *et al.* (2007). Vascular endothelial growth factor-C and its receptor VEGFR-3 in non-small-cell lung cancer: concurrent expression in cancer cells from primary tumour and metastatic lymph node. *Lung Cancer* **58**, 205-213.
- Sakurai,H., Asamura,H., Watanabe,S., Suzuki,K., and Tsuchiya,R. (2004). Clinicopathologic features of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Ann. Thorac. Surg.* **78**, 222-227.
- Salgia,R. (2011). Prognostic significance of angiogenesis and angiogenic growth factors in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **117**, 3889-3899.
- Salven,P., Ruotsalainen,T., Mattson,K., and Joensuu,H. (1998). High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer* **79**, 144-146.
- Samuels,Y., Wang,Z., Bardelli,A., Silliman,N., Ptak,J., Szabo,S. *et al.* (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**, 554.
- Sanchez-Cespedes,M. (2003). Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* **40**, 111-121.
- Sandler,A., Gray,R., Perry,M.C., Brahmer,J., Schiller,J.H., Dowlati,A., Lilenbaum,R., and Johnson,D.H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2542-2550.
- Sands,M., Howell,K., Costello,C.M., and McLoughlin,P. (2011). Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung. *Respir. Res.* **12**, 17.

- Sanmartin,E., Jantus-Lewintre,E., Sirera,R., Sanchez,J.J., Uso,M., Gallant,G. *et al.* (2012). Prognostic value of "angiogenic" risk score in early-stage NSCLC. *Journal of Clinical Oncology* 30, 10594.
- Sasco,A.J., Secretan,M.B., and Straif,K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 45 *Suppl* 2, S3-S9.
- Schwartz,A.G., Yang,P., and Swanson,G.M. (1996). Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives. *Am. J. Epidemiol.* 144, 554-562.
- Sekido,Y., Fong,K.M., and Minna,J.D. (2005). Cancer of the Lung. In: *Cancer. Principles & Practice of Oncology*, ed. V.T.De Vita, S.Hellman, and S.A.Rosenberg. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 745-841.
- Semenza,G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721-732.
- Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., and Dvorak,H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.
- Sessa,C., Guibal,A., Del Conte,G., and Rugg,C. (2008). Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5, 378-391.
- Shah,M.A., Kang,Y., Ohtsu,A., Roman,L., Nunes,J., Li,C., Delmar,P., Langer,B., Scherer,S.J., and Van Cutsem,E. (2011). Blood Plasma VEGFA Analysis in the AVAGAST Randomized Study of First-line Bevacizumab (bev) + Capecitabine/Cisplatin (cape/cis) in Patients (pts) With Advanced Gastric Cancer (AGC). *Eur. J. Cancer* 47, S173-S174.
- Shay,J.W. and Bacchetti,S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* 33, 787-791.
- Shi,Y.H. and Fang,W.G. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* 10, 1082-1087.
- Shibuya,M. (2001). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct. Funct.* 26, 25-35.
- Skobe,M., Hawighorst,T., Jackson,D.G., Prevo,R., Janes,L., Velasco,P., Riccardi,L., Alitalo,K., Claffey,K., and Detmar,M. (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* 7, 192-198.
- Smith,R.A., Cokkinides,V., and Brawley,O.W. (2009). Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J. Clin.* 59, 27-41.
- Soda,M., Choi,Y.L., Enomoto,M., Takada,S., Yamashita,Y., Ishikawa,S. *et al.* (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561-566.

- Spiro,S.G., Tanner,N.T., Silvestri,G.A., Janes,S.M., Lim,E., Vansteenkiste,J.F., and Pirker,R. (2010). Lung cancer: progress in diagnosis, staging and therapy. *Respirology*. *15*, 44-50.
- Suda,K., Tomizawa,K., and Mitsudomi,T. (2010). Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer Metastasis Rev.* *29*, 49-60.
- Suzuki,M., Iizasa,T., Ko,E., Baba,M., Saitoh,Y., Shibuya,K., Sekine,Y., Yoshida,S., Hiroshima,K., and Fujisawa,T. (2002). Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* *35*, 29-34.
- Takigawa,N., Segawa,Y., Fujimoto,N., Hotta,K., and Eguchi,K. (1998). Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res.* *18*, 1251-1254.
- Tamura,M., Oda,M., Tsunozuka,Y., Matsumoto,I., Kawakami,K., Ohta,Y., and Watanabe,G. (2004). Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Chest* *126*, 342-346.
- Tamura,M. and Ohta,Y. (2003). Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary nonsmall cell lung carcinoma: a possible diagnostic tool for lymph node metastasis. *Cancer* *98*, 1217-1222.
- Tamura,M., Ohta,Y., Kajita,T., Kimura,K., Go,T., Oda,M., Nakamura,H., and Watanabe,G. (2001). Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* *8*, 1097-1102.
- Tamura,M., Ohta,Y., Nakamura,H., Oda,M., and Watanabe,G. (2002). Diagnostic value of plasma vascular endothelial growth factor as a tumor marker in patients with non-small cell lung cancer. *Int. J. Biol. Markers* *17*, 275-279.
- Taron,M., Ichinose,Y., Rosell,R., Mok,T., Massuti,B., Zamora,L. *et al.* (2005). Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* *11*, 5878-5885.
- Tas,F., Duranyildiz,D., Oguz,H., Camlica,H., Yasasever,V., and Topuz,E. (2006). Circulating serum levels of angiogenic factors and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in melanoma patients. *Melanoma Res.* *16*, 405-411.
- Therasse,P., Arbuck,S.G., Eisenhauer,E.A., Wanders,J., Kaplan,R.S., Rubinstein,L. *et al.* (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 205-216.

- Tobler,N.E. and Detmar,M. (2006). Tumor and lymph node lymphangiogenesis--impact on cancer metastasis. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 691-696.
- Trape,J., Buxo,J., and de Olaguer,J.P. (2003). Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Chem.* *49*, 523-525.
- Travis,W.D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clin. Chest Med.* *23*, 65-81, viii.
- Travis,W.D., Brambilla,E., Noguchi,M., Nicholson,A.G., Geisinger,K.R., Yatabe,Y. *et al.* (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* *6*, 244-285.
- Tyczynski,J.E., Bray,F., and Parkin,D.M. (2003). Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol.* *4*, 45-55.
- Ustuner,Z., Saip,P., Yasasever,V., Vural,B., Yazar,A., Bal,C., Ozturk,B., Ozbek,U., and Topuz,E. (2008). Prognostic and predictive value of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2 levels in the sera of small cell lung cancer patients. *Med. Oncol.* *25*, 394-399.
- Van Cutsem,E., Jayson,G., Dive,C., Dilba,P., de Haas,S., Wild,N., Delmar,P., and Scherer,S.J. (2011). Analysis of Blood Plasma Factors in the AVITA Phase III Randomized Study of Bevacizumab (bev) With Gemcitabine-Erlotinib (GE) in Patients (pts) With Metastatic Pancreatic Cancer (mPC). *European Journal of Cancer* *47*, S95-S96.
- van't Westeinde,S.C. and van Klaveren,R.J. (2011). Screening and early detection of lung cancer. *Cancer J.* *17*, 3-10.
- Varey,A.H., Rennel,E.S., Qiu,Y., Bevan,H.S., Perrin,R.M., Raffy,S. *et al.* (2008). VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br. J. Cancer* *98*, 1366-1379.
- Veikkola,T., Karkkainen,M., Claesson-Welsh,L., and Alitalo,K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* *60*, 203-212.
- Verheul,H.M., Hoekman,K., Luykx-de,B.S., Eekman,C.A., Folman,C.C., Broxterman,H.J., and Pinedo,H.M. (1997). Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin. Cancer Res.* *3*, 2187-2190.
- Vivanco,I. and Mellinghoff,I.K. (2010). Epidermal growth factor receptor inhibitors in oncology. *Curr. Opin. Oncol.* *22*, 573-578.
- Volm,M., Koomagi,R., and Mattern,J. (1997). Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int. J. Cancer* *74*, 64-68.

- Wakelee,H.A., Wang,W., Schiller,J.H., Langer,C.J., Sandler,A.B., Belani,C.P., and Johnson,D.H. (2006). Survival differences by sex for patients with advanced non-small cell lung cancer on Eastern Cooperative Oncology Group trial 1594. *J. Thorac. Oncol.* **1**, 441-446.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269-270.
- Webb,N.J., Bottomley,M.J., Watson,C.J., and Brenchley,P.E. (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin. Sci. (Lond)* **94**, 395-404.
- Wei,S.C., Tsao,P.N., Yu,S.C., Shun,C.T., Tsai-Wu,J.J., Wu,C.H., Su,Y.N., Hsieh,F.J., and Wong,J.M. (2005). Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut* **54**, 666-672.
- Weinberg,R.A. (2007). *The Biology of Cancer*, New York: Garland Science,Taylor & Francis Group.
- Weis,S.M. and Cheresch,D.A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* **17**, 1359-1370.
- Werynska,B., Dziegiel,P., and Jankowska,R. (2009). Role of lymphangiogenesis in lung cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.* **47**, 333-342.
- Wheatley-Price,P., Blackhall,F., Lee,S.M., Ma,C., Ashcroft,L., Jitlal,M. *et al.* (2010). The influence of sex and histology on outcomes in non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of five randomized trials. *Ann. Oncol.* **21**, 2023-2028.
- White,J.D., Hewett,P.W., Kosuge,D., McCulloch,T., Enholm,B.C., Carmichael,J., and Murray,J.C. (2002). Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* **62**, 1669-1675.
- Wisnivesky,J.P. and Halm,E.A. (2007). Sex differences in lung cancer survival: do tumors behave differently in elderly women? *J. Clin. Oncol.* **25**, 1705-1712.
- Wissmann,C. and Detmar,M. (2006). Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6865-6868.
- Woo,I.S., Park,M.J., Byun,J.H., Hong,Y.S., Lee,K.S., Park,Y.S., Lee,J.A., Park,Y.I., and Ahn,H.K. (2004). Expression of placental growth factor gene in lung cancer. *Tumour. Biol.* **25**, 1-6.
- Woolard,J., Wang,W.Y., Bevan,H.S., Qiu,Y., Morbidelli,L., Pritchard-Jones,R.O. *et al.* (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* **64**, 7822-7835.

- Xu,L. and Jain,R.K. (2007). Down-regulation of placenta growth factor by promoter hypermethylation in human lung and colon carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 5, 873-880.
- Yamazaki,Y., Takani,K., Atoda,H., and Morita,T. (2003). Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J. Biol. Chem.* 278, 51985-51988.
- Yamazaki,Y., Tokunaga,Y., Takani,K., and Morita,T. (2005). Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry* 44, 8858-8864.
- Yano,T., Tanikawa,S., Fujie,T., Masutani,M., and Horie,T. (2000). Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer* 36, 601-609.
- Yokoyama,Y., Charnock-Jones,D.S., Licence,D., Yanaihara,A., Hastings,J.M., Holland,C.M. *et al.* (2003). Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br. J. Cancer* 88, 237-244.
- Youden,W.J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3, 32-35.
- Youlden,D.R., Cramb,S.M., and Baade,P.D. (2008). The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J. Thorac. Oncol.* 3, 819-831.
- Young,R.J., Tin,A.W., Brown,N.J., Jitlal,M., Lee,S.M., and Woll,P.J. (2012). Analysis of circulating angiogenic biomarkers from patients in two phase III trials in lung cancer of chemotherapy alone or chemotherapy and thalidomide. *Br. J. Cancer* 106, 1153-1159.
- Zetter,B.R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.* 49, 407-424.
- Zhan,P., Wang,J., Lv,X.J., Wang,Q., Qiu,L.X., Lin,X.Q., Yu,L.K., and Song,Y. (2009). Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J. Thorac. Oncol* 4, 1094-1103.
- Zhu,C.Q., Shih,W., Ling,C.H., and Tsao,M.S. (2006). Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J. Clin. Pathol.* 59, 790-800.

## VI. ANEXOS



## **1. Dictámenes: Comisión de Investigación y Comité Ético de Investigación Clínica**



## APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Valencia, 25 de Abril de 2012.

Esta Comisión tras evaluar en su reunión de 24 de Abril de 2012 el Proyecto de Investigación:

Título:	"Análisis de mediadores moleculares implicados en angiogénesis en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico: determinación de su valor como biomarcadores".		
I.P.:	Elena Sanmartín García	Servicio/Unidad	Laboratorio Oncología Molecular

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que cumple con los requisitos exigidos por esta Comisión para su realización, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dr. Guillermo Sáez Tormo  
Presidente de la Comisión de Investigación:





## APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

### - ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 28 de Junio de 2012 el Proyecto de Investigación:

Título:	"Análisis de mediadores moleculares implicados en angiogénesis en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico: determinación de su valor como biomarcadores".		
I.P.:	Elena Sanmartín García	Servicio/Unidad	Oncología Molecular

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que el Proyecto de Investigación y Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente	Ausente	Disculpa
Presidente	Dr. Severiano Marín	X		
Vocales	D. Ernesto Bataller			X
	D. Alejandro Moner	X		
	D. Germán García			X
	Dr. D. José Manuel Irazo			X
	Dr. D. Miguel Armengot			X
	Dr. D. Julio Cortijo	X		
	Dra. Dña. Elena Rubio			X
	Dr. D. Gustavo Juan	X		
	Dra. Pilar Blasco	X		
	Dña. M <sup>a</sup> Teresa Jareño			X
	Dra. M <sup>a</sup> José Safont	X		
	Dr. José Luis Fayos			X
	Dr. Agustín Herrera			X
	Dra. Ana Blasco			X
	Dr. Antonio Martorell			X
	Dr. Aurelio Quesada			X
Dra. Begoña Peris	X			

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

Dr. Fco. Javier Cervera  
Dr. José Vte. Roig Vila  
Dr. Rafael Poveda  
Dra. Inmaculada Sáez  
Dr. Alberto Berenguer  
Dra. Amparo Pérez  
Dña. Encarna Domingo  
Dra. Ana Minguez

Secretario

		X
X		
X		
X		
		X
X		
X		
X		

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dr. Severiano Marín (Presidente  
CEIC)



## 2. Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales

- R. Sirera, **E. Sanmartín**, E. Jantus, A. Blasco, C. Caballero, S. Gallach, P. Olmo, N. del Pozo, R.M. Bremnes, C. Camps. Soluble levels of VEGF-A and VEGFR-2 in patients with advanced NSCLC. *J Thorac Oncol.* 5 (5), supplement 1, 2010: Abstr 1350. 2nd European Lung Cancer Conference 2010. Geneva, Switzerland, 28 Abril - 1 Mayo 2010.

- **E. Sanmartín**, E. Jantus, A. Blasco, R. Sirera, C. Caballero, S. Gallach, R. M. Bremnes, N. del Pozo, A. Berrocal, C. Camps. Plasma levels of VEGF-A and VEGFR-2 in advanced NSCLC. *J. Clin. Oncol.* 28: 15s, 2010: Abstr e10623. 2010 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago, Illinois, USA, 4- 8 de Junio, 2010.

- **E. Sanmartín**, S. Gallach, R. Sirera, C. Hernando, A. Honguero, R. Guijarro, M. Martorell, A. Arnau, C. Camps, E. Jantus-Lewintre. Prognostic implications of lymphangiogenic markers in early-stage NSCLC. *J. Clin. Oncol.* 29, 15s, 2011: e21108. 2011 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago, Illinois, USA, 3-7 de Junio, 2011.

- **E. Sanmartín**, E. Jantus Lewintre, R. Sirera, S. Gallach, M. Usó, A. Blasco, C. Hernando, E. Palomares, R. Guijarro, C. Camps. Expression of angiogenic and lymphangiogenic genes as biomarkers of prognosis in early-stage NSCLC. *J Thorac Oncol*, 6, supplement 2, 2011: S1022-3. 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer. International Association for the study of lung cancer (IASLC). Amsterdam, Netherland, 3-7 de Julio, 2011.

- **E. Sanmartín**, M. Usó, R. Sirera, C. Hernando, S. Gallach, E. Casimiro, A. Blasco, M. Martorell, R. Guijarro, E. Jantus Lewintre, C. Camps. Expression of lymphangiogenic genes as biomarkers of prognosis in early-stage NSCLC. Libro de comunicaciones: P30. XIII congreso nacional ASEICA, Salamanca, España, 21- 23 de Septiembre de 2011.

- **E. Sanmartín**, M. Usó, E. Jantus-Lewintre, C. Hernando, S. Gallach, A. Blasco, E. Casimiro, M. Martorell, R. Guijarro, C. Camps. Implicaciones pronósticas de marcadores angiogénicos y linfangiogénicos en pacientes con CPNM reseccables. Libro de comunicaciones: O-26. XIII Congreso Nacional SEOM, Málaga, España, 19-21 de Octubre de 2011.

- **E. Sanmartín**, E. Jantus-Lewintre, R. Sirera, J. J. Sanchez, M. Usó, S. Gallach, A. Blasco, C. Hernando, N. Martínez, S. Figueroa, C. D. Rolfo, R. Guijarro, M. Martorell, C. Camps. "Angiogenic" risk score has prognostic value in early-stage NSCLC. *J. Clin. Oncol.* 30, 15s, 2012:10594. 2012 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago, Illinois, USA, 1-5 de Junio, 2012.

### **3. Publicaciones derivadas de la tesis doctoral**





## Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: Diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC

Eloisa Jantus-Lewintre<sup>a</sup>, Elena Sanmartín<sup>a</sup>, Rafael Sirera<sup>a,b</sup>, Ana Blasco<sup>c</sup>, José Javier Sanchez<sup>d</sup>, Miquel Tarón<sup>e</sup>, Rafael Rosell<sup>e</sup>, Carlos Camps<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Oncology Laboratory, Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Department of Biotechnology, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain

<sup>c</sup> Department of Medical Oncology, Consorcio Hospital General Universitario, Valencia, Spain

<sup>d</sup> Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Medical Oncology Service, Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 October 2010

Received in revised form 21 January 2011

Accepted 27 February 2011

#### Keywords:

Advanced NSCLC

Biomarkers

Prognostic

VEGF

VEGFR-2

### ABSTRACT

**Introduction:** The vascular endothelial growth factor (VEGF) family of ligands and receptors (VEGFR) play an important role in tumor angiogenesis. Increased expression of angiogenic factors in tumors or in blood is associated with poor prognosis. The aim of this study was to investigate the role of VEGF-A and soluble VEGFR-2 (sVEGFR-2) as biomarkers in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC).

**Methods:** We studied 432 patients with advanced NSCLC (stages IIIB–IV) treated with cisplatin and docetaxel and 89 healthy age-matched controls. Blood samples were collected before chemotherapy, and VEGF-A and sVEGFR-2 levels were determined by ELISA.

**Results:** VEGF-A and sVEGFR-2 levels were higher in NSCLC patients than in the controls, but VEGF-A behaves as a better diagnostic biomarker. There were no significant associations between VEGF-A and sVEGFR-2 concentrations and clinical characteristics, such as ECOG-PS, gender, stage, histology, metastases, and treatment response. A patient subgroup characterized by a combination of high VEGF-A and low sVEGFR-2 levels exhibited the worst patient prognoses in terms of TTP and OS.

**Conclusions:** VEGF-A and sVEGFR-2 levels were significantly higher in patients than in the controls. A combination of VEGF-A and sVEGFR-2 can be used as an independent prognostic biomarker in advanced NSCLC.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lung cancer is one of the most common cancers in the world today in terms of both incidence and mortality [1]. Surgery is a potentially curative measure in early stage non-small-cell lung cancer (NSCLC); however, most patients have advanced, unresectable disease at diagnosis, which typically has a poor prognosis [2]. The current standard of care for patients with advanced NSCLC is systemic platinum-based chemotherapy [3,4]. However, the low response rates and the modest benefit in overall survival indicate the need to define new individualized strategies and to develop novel therapeutic strategies based on a better understanding of tumor biology.

Tumor cell growth and the metastatic capacity of solid tumors depend on angiogenesis. Pro-angiogenic factors secreted by tumor cells and/or host factors stimulate endothelial cells to proliferate and form new blood vessels that are qualitatively poor and leaky. Of these factors, vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most important mediator involved in the angiogenic process [5,6] regulating endothelial sprouting and increasing vessel permeability and contributing to the mobilization and recruitment of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial progenitor cells to tumors [7,8]. All these biological effects postulated this pro-angiogenic factor as a key target for antivascular therapy [9,10]. VEGF intracellular signaling is exerted via three tyrosine-kinase receptors (VEGFR): VEGFR1 (also known as Flt1); VEGFR-2 (KDR/Flk1), which is the receptor with the strongest kinase activity; and VEGFR3 (Flt4). VEGFR-2 forms high affinity complexes with VEGF-A and is primarily present in vascular endothelial and tumor cells. Several studies have shown that a high VEGFR-2 expression in tumor and endothelial cells relates to worse prognoses in patients with different tumors [11–15]. Soluble VEGFR-2 (sVEGFR-2) is a set of differently sized fragments of the receptor extracellular domains.

\* Corresponding author at: Servicio de Oncología Médica, Hospital General Universitario de Valencia, Av. Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain.

Tel.: +34 961 972 000x72184; fax: +34 961 972 151.

E-mail address: [camps.car@gva.es](mailto:camps.car@gva.es) (C. Camps).

The sVEGFR2 retains a high binding affinity to VEGF-A, but does not activate the downstream signal transduction cascade because it lacks the tyrosine kinase domain [16].

Identifying circulating markers of angiogenesis that can assist in diagnosis, staging, treatment response, and follow-up of cancer patients is a challenging issue. Multiple angiogenic growth factors in blood have been investigated in a variety of tumors. For example, elevated VEGF, FGF, and HGF in biological fluids have been associated with staging, progression, and prognosis in certain tumors [17–22]. There are some reports showing promising results using VEGF-A and sVEGFR-2 as biomarkers in lung cancer [17,21,23–27]. Therefore, the aim of this study, in a large cohort of patients with advanced NSCLC, was to determine circulating levels of VEGF-A and sVEGFR-2 as single or combined biomarkers and to correlate them with some clinico-pathological, diagnostic, and prognostic variables, such as time to progression (TTP) and overall survival (OS).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and controls

We retrospectively analyzed 432 samples from patients enrolled in a multicenter study coordinated by the Spanish Lung Cancer Group. The clinical study was accomplished between February 2003 and January 2005. Eligibility criteria were the diagnosis of stage IIIB disease with pleural effusion or stage IV NSCLC. Patients were treated with cisplatin (75 mg/m<sup>2</sup>) and docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>) on day 1 every 3 weeks. The control group consisted of 89 anonymous, aged- and gender-matched, healthy volunteers without any acute or chronic inflammatory conditions. Control samples were taken along the same period of time than patient samples. All individuals provided informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and applicable local regulatory requirements and laws. The institutional ethical review board approved the study protocol (details on inclusion and exclusion criteria, treatment, evaluation and laboratory procedures are provided in [Supplementary Material](#)).

### 2.2. Samples

Patients' peripheral blood samples were collected prior to chemotherapy. Ten milliliters of peripheral blood were collected in tubes containing EDTA as anticoagulant (BD Vacutainer®, USA). These tubes were sent to a reference laboratory within 24 h of blood collection. Blood samples were subjected to two centrifugation steps: an initial centrifugation for 10 min at 1100 × g at room temperature (RT) and a second centrifugation of the supernatants for 10 min at 2000 × g at RT in order to eliminate any possible cell fragments from the blood. Plasma aliquots were immediately stored at –80 °C until further analysis.

### 2.3. VEGF-A and VEGFR-2 quantification

Plasma samples were thawed on ice, and the VEGF-A and VEGFR-2 concentrations were determined using a double sandwich ELISA (Duo Set, R&D Systems). The VEGF-A standard curve ranged from 0 to 2000 pg/mL, and the lower limit of detection was 31.2 pg/mL. For the quantification of VEGFR-2, plasma samples were diluted 1:25 in 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA) in PBS. The VEGFR-2 standard curve ranged from 0 to 1000 pg/mL with a minimum detectable dose of 15.6 pg/mL (see [Supplementary Material](#)).

### 2.4. Statistical analysis

Because the VEGF-A and sVEGFR-2 variables did not follow a normal distribution, the comparisons and correlations with categorical variables were conducted using the non-parametric Mann–Whitney *U*-test or Kruskal–Wallis test. The association between dichotomized variables was evaluated using the  $\chi^2$  test. The performance of each parameter in the prediction of disease vs. control status was evaluated by means of the receiver operating characteristic (ROC) curve, and the area under the curve (AUC) was measured. Differences between ROC curves were estimated according to DeLong methods [28]. Confidence intervals for the AUC were calculated according to Hanley and McNeil [29]. The best cut-off value was selected using the Youden index.

The OS was calculated from the date of diagnosis and the TTP was calculated from the date treatment started. OS and TTP curves were plotted according to the Kaplan–Meier method, and differences between groups were assessed using the log-rank test. Cox-regression analysis was used for multivariate analysis. All statistically significant variables from the univariate analyses were entered into the multivariate Cox analysis. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

The most relevant demographic and clinico-pathologic characteristics of the patient population are shown in [Table 1](#). The median age was 59, and 84% of the patients were male. The majority of patients were in Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) PS = 1 (73%), 50% had adenocarcinoma, and 84% had stage IV NSCLC. In the control group, the median age at the time of sampling was 57.2 (32–88) years, 77% were males. There were no significant differences in age and gender between patients and controls.

**Table 1**  
Patient characteristics.

	N	%
Total	432	100
Age		
Median	59	
Range	31–80	
Gender		
Male	361	83.6
Female	71	16.4
Histology		
ADC	217	50.2
SCC	133	30.8
LCC	66	15.3
Others	16	3.7
Stage		
IIIB	68	15.7
IV	364	84.3
ECOG-PS		
0	107	24.8
1	317	73.4
2	6	1.4
NA	2	0.5
Response <sup>a</sup>		
CR	3	0.7
PR	104	24.1
SD	141	32.6
PD	152	35.2
NA	32	7.4

ADC: adenocarcinomas; SCC: squamous cell carcinomas; LCC: large cell carcinomas; CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progressive disease; NA: not available.

<sup>a</sup> Tumor response was evaluated according to the Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST) [51].

**Table 2**

Plasma levels of VEGF and VEGFR-2 in patients with NSCLC and in healthy controls (Median and range).

	VEGF (pg/mL)	VEGFR-2 (pg/mL)
Patients	69.7 (0.8–664.7)	8047 (2901–17761)
Controls	12.4 (0.5–314.7)	6796 (3483–11283)
<i>p</i> *	<0.0001	<0.0001

\* Mann–Whitney test.

### 3.1. VEGF-A and sVEGFR-2 plasma levels

VEGF-A and sVEGFR-2 concentrations were determined in 77 and 89 controls and in 388 and 432 patients, respectively (in 12 controls and 44 patients we did not have enough plasma to perform the VEGF-A measurement). We found a significant increase in VEGF-A and VEGFR-2 plasma concentrations in patients ( $p < 0.0001$ , for both) in comparison to the healthy controls (Table 2).

The optimal predictive models based on VEGF-A and sVEGFR-2 to distinguish patients from controls yielded AUCs of 0.862 (95% CI, 0.814–0.911) and 0.666 (95% CI, 0.612–0.720), respectively (Fig. 1). We found significant differences between them ( $p < 0.0001$ ,  $\chi^2$  test), being VEGF-A a more suitable biomarker for discriminating between patients and controls. The cut-off value for VEGF-A that best distinguishes NSCLC patients from controls was 37.5 pg/mL (74.5% sensitivity and 85.7% specificity) selected by Youden index.

### 3.2. Association between VEGF-A and sVEGFR-2 and clinico-pathological variables

There were no significant associations between plasma VEGF-A and VEGFR-2 concentrations and clinical characteristics, such as ECOG-PS ( $p = 0.312$  and  $p = 0.177$ ), gender ( $p = 0.106$  and  $p = 0.519$ ), stage ( $p = 0.115$  and  $p = 0.108$ ), histology ( $p = 0.307$  and  $p = 0.466$ ), number of metastatic locations ( $p = 0.079$  and  $p = 0.681$ ), and response to treatment ( $p = 0.655$  and  $p = 0.079$ ). There were 107 patients (24.8%) with clinical responses (complete or partial responses), and 293 patients (67.8%) were with stable (SD) or progressive disease (PD) (see Table 1 for detailed information). We observed lower sVEGFR-2 levels in patients with SD or PD, than in patients with CR and PR, but the differences were non significant. In terms of age, patients over 60 years old had significantly lower levels of VEGFR-2 ( $p < 0.0001$ ), whereas no differences were found in VEGF-A ( $p = 0.811$ ).

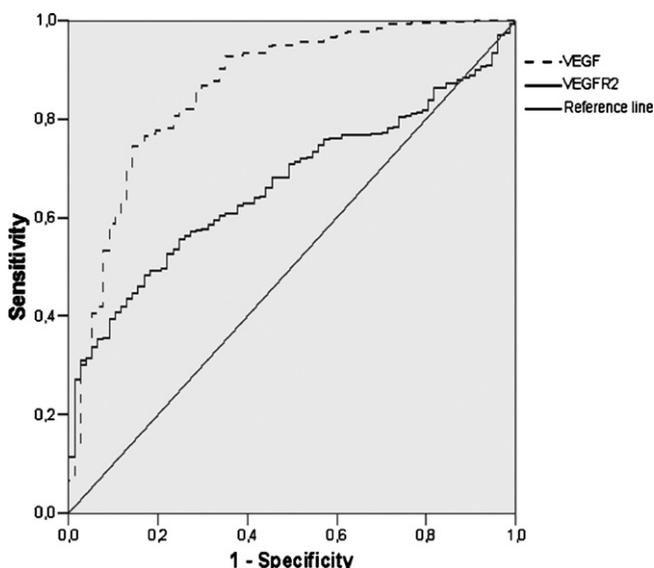


Fig. 1. ROC curves.

### 3.3. VEGF-A and VEGFR-2 and survival

In our cohort, the median follow-up was 9.65 months (0.53–45.43), 393 (91.0%) patients progressed and 356 out of 432 (82.4%) patients died.

We evaluated VEGF-A and VEGFR-2 as possible biomarkers of prognosis in relation to two end points: TTP and OS. Following the dichotomization of VEGF-A and using a cut-off level of 140.7 pg/mL (75th percentile), TTP and OS were not significantly associated with plasma VEGF-A concentrations even though there was a trend showing that patients with higher pre-treatment levels of VEGF-A (>75th percentile) had shorter TTP ( $p = 0.162$ ) and OS ( $p = 0.059$ ). When we restricted the analysis to only adenocarcinomas, we found that there were significant differences in TTP between the two groups ( $p = 0.040$ ).

In the case of VEGFR-2, when we divided patients according to VEGFR-2 plasma concentration with a cut-off level of 9936 pg/mL (75th percentile), there was a trend to a shorter TTP in the group of patients with lower levels of sVEGFR-2 ( $p = 0.131$ ). When the analysis was restricted to only patients in stage III, the differences in TTP and OS were statistically significant ( $p = 0.003$  and  $p = 0.028$ , respectively).

Remarkably, we found that patients belonging to a subgroup characterized by a combination of high levels of VEGF-A (>75th percentile) and low levels of sVEGFR-2 ( $\leq 75$ th percentile) had the worst prognoses in terms of TTP (4.4 months vs. 5.8 months, respectively;  $p = 0.007$ ) and OS (7.5 months vs. 10.4 months, respectively;  $p = 0.002$ ) when compared to other possible combinations of VEGF-A and sVEGFR2 concentrations (Fig. 2A and B). As shown in Table 3, the subgroup of worse prognosis, represented by patients showing combined high levels of VEGF-A and low levels of sVEGFR-2 compared with the subgroup of better prognosis (all other possible combinations of both variables), were exactly matched on age and the frequencies of histologic types, ECOG-PS, gender and response

**Table 3**

Patient characteristics according to levels of VEGF-A and sVEGFR-2.

Patient demographics	High VEGF-A and low sVEGFR-2		Others		<i>p</i>
	No.	%	No.	%	
Total	71	100	317	100	
Age					
Median	59.9		59.7		
Range	33.9–78		30.7–79.2		0.93
Gender					
Male	62	87.3	261	82.3	
Female	9	12.7	56	17.7	0.38
Histology					
ADC	34	47.9	161	50.8	
SCC	23	32.4	101	31.9	
LCC	12	16.9	45	14.2	
Others	2	2.8	10	3.2	0.94
Stage					
IIIB	14	19.7	49	15.5	
IV	57	80.3	268	84.5	0.38
ECOG					
0	12	16.9	84	26.5	
1	58	81.7	230	72.6	
2	0	0	2	0.6	
NA	1	1.4	1	0.3	0.19
Response					
CR	0	0	3	1	
PR	14	19.7	77	24.3	
SD	18	25.3	110	34.7	
PD	31	43.7	105	33.1	
NA	8	11.3	22	6.9	0.20

ADC: adenocarcinomas; SCC: squamous cell carcinomas; LCC: large cell carcinomas; CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progressive disease; NA: not available.

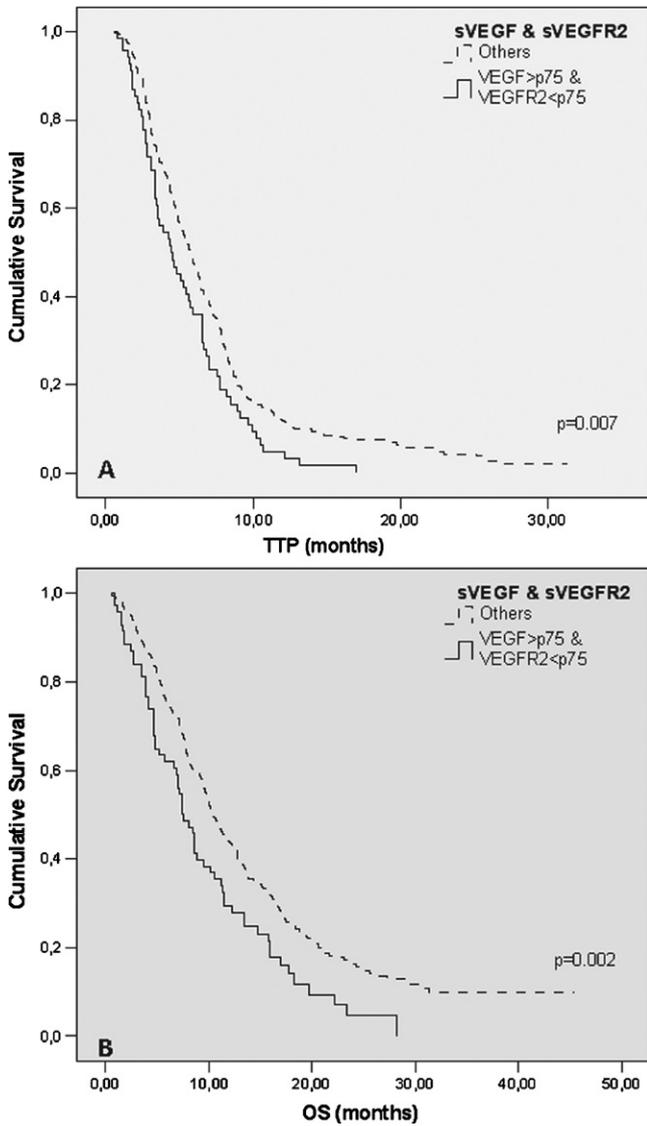


Fig. 2. Kaplan–Meier plots according to VEGF-A and sVEGFR-2 plasma levels. (A) TTP and (B) OS.

were not significantly different between the two groups, suggesting that the differences found in the median TTP and OS between them may be due to the different levels of circulating VEGF-A and VEGFR-2. Therefore, the use of a combination of plasma levels of both angiogenic markers (VEGF-A and sVEGFR-2) allowed us to identify a subgroup of patients with different prognosis.

Table 4  
Multivariate Cox regression analysis for TTP and OS.

	TTP			OS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
ECOG-PS						
0				1.00		
1–2	–	–	0.135	1.44	1.11–1.87	0.006*
Gender						
Female	1.00			1.00		
Male	1.43	1.07–1.90	0.014*	1.45	1.07–1.98	0.017*
VEGF-A and sVEGFR-2						
Others	1.00			1.00		
High VEGF-A and low sVEGFR-2	1.44	1.09–1.88	0.009*	1.49	1.12–1.97	0.006*

HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

\* p < 0.05, statistically significant.

A multivariate Cox regression model for TTP and OS was built using the variables that were found significant in the univariate analysis (gender, ECOG-PS, and the combined variable of VEGF-A and sVEGFR-2). Regarding TTP, this analysis revealed that only the combined variable VEGF-A and sVEGFR-2 and gender were independent prognostic in our patient population. Moreover, VEGF-A and sVEGFR-2, ECOG-PS, and gender were independent prognostic markers for OS (Table 4).

#### 4. Discussion

The assessment of angiogenic markers in peripheral blood has a potential advantages over the evaluation of angiogenic activity in tumor tissue because it allows all cancer patients to be evaluated without the need for surgical specimens or biopsy material, which is an important issue for advanced NSCLC patients because they do not always have readily available biopsy specimens. Scientific evidence has shown that tumor cells secrete VEGF, which binds to the corresponding receptor, primarily on endothelial cells, inducing tumor proliferation, angiogenesis, and metastasis [5,30,31]. It has also been postulated, using *in vivo* and *in vitro* models, that VEGF levels are an important modulator of sVEGFR-2 levels [32], which has been detected in the serum of cancer patients [33,34]. Several studies support the role of sVEGFR-2 as a potent and selective inhibitor of VEGF-mediated angiogenesis [16,35], as an endogenous selective inhibitor of lymphatic vessel growth [36] and mural cell recruitment [37].

Circulating VEGF-A or VEGFRs protein levels have been related to patient tumor burden [32,38,39], but it is important to consider that tumor-associated stroma and other non-tumor tissues could also contribute to it [40,41]. Regarding its potential diagnostic usefulness, in this large scale study based on the analysis of VEGF-A and VEGFR-2 plasma levels in advanced NSCLC patients, we found that both angiogenic markers exhibited higher plasma concentrations in NSCLC patients in comparison to age- and sex-matched controls, which agrees with previous reports (reviewed by Poon et al.) [42]. According to our data, VEGF-A behaves better than sVEGFR-2, allowing the discrimination between patients and controls with adequate specificity (85.7%) and sensitivity (74.5%), using a cut off value of 37.5 pg/ml.

Even though, one possible limitation in the performance of sVEGF as a diagnostic biomarker that should be considered in this study is the missing of clinical data from the control group (like professional exposure, smoking habits, personal and family history of cancer, and lung function) that, in some cases may bias the results.

Bremnes et al. [43] reviewed the controversial role of VEGF-A as a prognostic marker in NSCLC. Some studies have indicated that pre-chemotherapy VEGF-A or sVEGFR-2 levels correlate with disease activity and prognosis [14]; however, other studies have produced inconclusive evidence concerning the reliability or pre-

dictability of this correlation [17,44]. Hanrahan et al. reported that low baseline circulating VEGF was associated with a better progression free survival in patients with advanced NSCLC treated with anti-angiogenic drugs [45]. The conflicting results of the previous reports related to the prognostic or predictive value of the analyzed biomarkers could be explained, at least in part, by the choice of heterogeneous patient population, the small size of the analyzed cohorts and also the selection of the matrix used for the assessment of circulating biomarkers. In this regard, we selected EDTA-plasma as the most appropriate analytical matrix for our study, because serum samples may not be representative of *in vivo* conditions due to the activation of proteases during clotting (altering specially the levels of sVEGFR-2), and the releasing of the contents of platelets and other blood cells [46–48].

The large size of our cohort focusing only in advanced-stage patients, allowed us to study more patients than any other prior investigation ( $n=432$ ). We observed no significant correlation between VEGF-A or sVEGFR-2 levels and prognosis. However, there were trends of shorter TTP and OS in the patient group with higher levels of VEGF-A, while the same trend in TTP was observed in the patient group with lower levels of sVEGFR-2. Interestingly, most of the associations between outcome and levels of single circulating angiogenic factors in our study were seen when we analyzed more homogeneous groups of patients, such as VEGF-A in adenocarcinomas or sVEGFR-2 in stage III patients. To our knowledge, it seems improbable that a single angiogenic marker will provide all of the significant clinical information because only one biomarker cannot reveal the complexity of the angiogenic process, and single biomarkers seems to be more significant for certain histological subtypes of tumors or at certain stages of tumor growth, as shown in this study; however, when the markers were considered in combination, they provided a more comprehensive pattern or profile, significantly improving their prognostic value, as was shown previously in hepatocarcinomas (using sVEGFR-1 and PIGF) and pancreatic cancer (using sVEGFR-1 and VEGF) [49,50].

We identified a patient subgroup defined by a combination of high VEGF-A and low sVEGFR-2 levels that exhibited a poor outcome and resulted in an independent prognostic factor for TTP and OS in the multivariate analysis. These findings suggest that studies investigating more than one marker could yield additional information based on the prognostic significance of different angiogenic phenotypes. Additionally, if tissue samples had been available in our retrospective cohort, it would have been very interesting to compare tumor biopsy microvessel densities (MVDs) with the circulating VEGF-A and sVEGFR-2 levels in order to assess a possible role as surrogate biomarker of angiogenesis. The worst patient prognoses in the patient group with high VEGF-A and low sVEGFR-2 levels suggest that, because of the trapping effect of sVEGFR-2 in patients with low levels of sVEGFR-2, there is more VEGF-A available to stimulate and mobilize bone marrow-derived hematopoietic and endothelial progenitor cells.

## 5. Conclusion

According to our data, we have identified a subpopulation of NSCLC patients that displays a specific angiogenic profile (combined high VEGF-A and low sVEGFR-2 levels), which seems to have a more aggressive disease behavior. Therefore, this profile could be used as an independent biomarker of prognosis in advanced NSCLC. We suggest that angiogenic profiles may provide insight into the biological effects of anti-angiogenic treatments and considering the increasing interest in targeting VEGF-A system, and the emerging data about the changes in the circulating levels of VEGF-A and sVEGFR-2 after the administration of anti-angiogenic thera-

pies, it could be appealing to validate these findings in prospective and ad-hoc designed clinical trial.

## Conflict of interest

None declared.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the collaboration of the following investigators from the Spanish Lung Cancer Group (GCEP): R. de las Peñas, G. Alonso, G. López Vivanco, M. Provencio, R. Rosell, J.L. González Larriba, A. Artal, R. García Gómez, N. Viñolas, J. Terrasa, F. Barón, B. Massuti, E. Pujol Obis, A. Carrato, R. Colomer, J.M. Puerto-Pica, P. Martínez, P. Diz, P. Bueso, P. Lianes, B. Medina, I. Barreto, D. Gutierrez Abad, C. Mesía, I. Moreno, C. Madroñal, T. de Portugal, M. Saldaña, M. Viricuela, M. López Brea, L. Jolis, R. Pérez Carrión, I. Manchegs, A. Arizcun, F. Arranz, Glez-Ageitos, J. García García, J. García Marco, I. Porras, I. Maestu, C. Santander, Álvarez de Mon, Burillo.

**Funding:** This work was supported in part, by a grant [PI06/104] from Instituto de Salud Carlos III and a grant [RD06/0020/1024] from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation and European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa”.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.lungcan.2011.02.016.

## References

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108.
- [2] Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–1999: results of the EUROCARE-4 study 1. *Lancet Oncol* 2007;8:773–83.
- [3] Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker Jr S, et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* 2004;22:330–53.
- [4] Azzoli CG, Baker Jr S, Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:6251–66.
- [5] Lund EL, Thorsen C, Pedersen MW, Junker N, Kristjansen PE. Relationship between vessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in small cell lung cancer in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* 2000;6:4287–91.
- [6] Roskoski Jr R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62:179–213.
- [7] Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194–201.
- [8] Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175–89.
- [9] Saranadasa M, Wang ES. Vascular endothelial growth factor inhibition: conflicting roles in tumor growth. *Cytokine* 2010.
- [10] Eichholz A, Merchant S, Gaya AM. Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management. *Oncol Targets Ther* 2010;3:69–82.
- [11] Xia G, Kumar SR, Hawes D, Cai J, Hassanieh L, Groshen S, et al. Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer. *J Urol* 2006;175:1245–52.
- [12] Giatromanolaki A, Bai M, Margaritis D, Bourantas KL, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. Hypoxia and activated VEGF/receptor pathway in multiple myeloma. *Anticancer Res* 2010;30:2831–6.
- [13] Ryden L, Jirstrom K, Haglund M, Stal O, Ferno M. Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:491–8.
- [14] Seto T, Higashiyama M, Funai H, Imamura F, Uematsu K, Seki N, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;53:91–6.

- [15] An SJ, Nie Q, Chen ZH, Lin QX, Wang Z, Xie Z, et al. KDR expression is associated with the stage and cigarette smoking of the patients with lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:635–42.
- [16] Kou B, Li Y, Zhang L, Zhu G, Wang X, Li Y, et al. In vivo inhibition of tumor angiogenesis by a soluble VEGFR-2 fragment. *Exp Mol Pathol* 2004;76:129–37.
- [17] Tamura M, Ohta Y, Kajita T, Kimura K, Go T, Oda M, et al. Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2001;8:1097–102.
- [18] Tamura M, Oda M, Tsunozuka Y, Matsumoto I, Kawakami K, Ohta Y, et al. Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Chest* 2004;126:342–6.
- [19] Braybrooke JP, O'Byrne KJ, Propper DJ, Blann A, Saunders M, Dobbs N, et al. A phase II study of razoxane, an antiangiogenic topoisomerase II inhibitor, in renal cell cancer with assessment of potential surrogate markers of angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:4697–704.
- [20] Coskun U, Gunel N, Sancak B, Gunel U, Onuk E, Bayram O, et al. Significance of serum vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-I levels and nitric oxide activity in breast cancer patients. *Breast* 2003;12:104–10.
- [21] Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, Poyraz BM, Celik G, Sen E, et al. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med* 2004;98:632–6.
- [22] Li L, Wang L, Zhang W, Tang B, Zhang J, Song H, et al. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. *Anticancer Res* 2004;24:1973–9.
- [23] Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, Knuffmann C, Vohwinkel G, et al. Pre-treatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2002;13:1550–7.
- [24] Sessa C, Guibal A, Del Conte G, Ruegg C. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5:378–91.
- [25] Roselli M, Mineo TC, Basili S, Mariotti S, Martini F, Bellotti A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) plasma levels in non-small cell lung cancer: relationship with coagulation and platelet activation markers. *Thromb Haemost* 2003;89:177–84.
- [26] Dror MM, Regan MM, Oh WK, Kaufman DS, Olivier K, Michaelson SZ, et al. Phase II study of sunitinib in men with advanced prostate cancer. *Ann Oncol* 2009;20:913–20.
- [27] Brostjan C, Bayer A, Zommer A, Gornikiewicz A, Roka S, Benko T, et al. Monitoring of circulating angiogenic factors in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Cancer* 2003;98:2291–301.
- [28] DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837–45.
- [29] Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143:29–36.
- [30] Dougher-Vermazen M, Hulmes JD, Bohlen P, Terman BI. Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:728–38.
- [31] Terman BI, Carrión ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991;6:1677–83.
- [32] Ebos JM, Lee CR, Bogdanovic E, Alami J, Van Slyke P, Francia G, et al. Vascular endothelial growth factor-mediated decrease in plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 levels as a surrogate biomarker for tumor growth. *Cancer Res* 2008;68:521–9.
- [33] Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS, et al. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:327–38.
- [34] Hanrahan EO, Lin HY, Kim ES, Yan S, Du DZ, McKee KS, et al. Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:193–201.
- [35] Kuhnert F, Tam BY, Sennino B, Gray JT, Yuan J, Jocson A, et al. Soluble receptor-mediated selective inhibition of VEGFR and PDGFRbeta signaling during physiologic and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10185–90.
- [36] Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* 2009;15:1023–30.
- [37] Lorquet S, Berndt S, Blacher S, Gengoux E, Peulen O, Maquoi E, et al. Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. *FASEB J* 2010.
- [38] Brattstrom D, Bergqvist M, Hesselius P, Larsson A, Lamberg K, Wernlund J, et al. Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary tumours and poorer survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2002;37:57–63.
- [39] Bocci G, Man S, Green SK, Francia G, Ebos JM, du Manoir JM, et al. Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2004;64:6616–25.
- [40] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004;9(Suppl. 1):2–10.
- [41] Kut C, Mac GF, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer* 2007;97:978–85.
- [42] Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19:1207–25.
- [43] Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51:143–58.
- [44] Chakra M, Pujol JL, Lamy PJ, Bozonnet MC, Quantin X, Jacot W, et al. Circulating serum vascular endothelial growth factor is not a prognostic factor of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008;3:1119–26.
- [45] Hanrahan EO, Ryan AJ, Mann H, Kennedy SJ, Langmuir P, Natale RB, et al. Baseline vascular endothelial growth factor concentration as a potential predictive marker of benefit from vandetanib in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3600–9.
- [46] Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001;47:617–23.
- [47] Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77:956–64.
- [48] Lee JK, Hong YJ, Han CJ, Hwang DY, Hong SI. Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients: which is the optimal specimen? *Int J Oncol* 2000;17:149–52.
- [49] Nagaoka S, Yoshida T, Akiyoshi J, Akiba J, Hisamoto T, Yoshida Y, et al. The ratio of serum placenta growth factor to soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 predicts the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2010;23:1647–54.
- [50] Chang YT, Chang MC, Wei SC, Tien YW, Hsu C, Liang PC, et al. Serum vascular endothelial growth factor/soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 ratio is an independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Pancreas* 2008;37:145–50.
- [51] Therasse P, Arbutk SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205–16.



# RightsLink®

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


**Title:** Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: Diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC

Logged in as:  
Rafael Sirera

[LOGOUT](#)

**Author:** Eloisa Jantus-Lewintre, Elena Sanmartín, Rafael Sirera, Ana Blasco, José Javier Sanchez, Miquel Tarón, Rafael Rosell, Carlos Camps

**Publication:** Lung Cancer

**Publisher:** Elsevier

**Date:** November 2011

Copyright © 2011, Elsevier

## Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Rafael Sirera ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	2978160595463
License date	Aug 29, 2012
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Lung Cancer
Licensed content title	Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: Diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC
Licensed content author	Eloisa Jantus-Lewintre, Elena Sanmartín, Rafael Sirera, Ana Blasco, José Javier Sanchez, Miquel Tarón, Rafael Rosell, Carlos Camps
Licensed content date	November 2011
Licensed content volume number	74
Licensed content issue number	2
Number of pages	6
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Analisis de mediadores moleculares implicados en angiogenesis en pacientes con cancer de pulmon no microcitico: determinacion de su valor como biomarcador
Expected completion date	Jan 2013
Estimated size (number of pages)	130
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.00 EUR

[ORDER MORE...](#)
[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2012 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#).



# Update on biomarkers for the detection of lung cancer

Eloisa Jantus-Lewintre<sup>1</sup>

Marta Usó<sup>1</sup>

Elena Sanmartín<sup>1</sup>

Carlos Camps<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology Laboratory, Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario, Valencia, Spain; <sup>2</sup>Department of Medical Oncology, Consorcio Hospital General Universitario, Valencia, Spain; <sup>3</sup>Department of Medicine, Universitat de València, Valencia, Spain

**Abstract:** Patients at risk for lung cancer may have subclinical disease for years before presentation. The diagnosis of this disease is primarily based on symptoms, and detection often occurs after curative intervention is no longer possible. At present, no lung cancer early-detection biomarker is clinically available. This study reviews the most recent advances in early detection and molecular diagnostic biomarkers for the detection of lung cancer. This review includes an overview of the various biological specimens and matrices in which these biomarkers could be analyzed, as well as the diverse strategies and approaches for identifying new biomarkers that are currently being explored. Several novel and attractive biomarker candidates for the early detection of lung cancer exist. A remarkable shift is taking place from research based on single markers to analyzing signatures that are more complex in order to take advantage of new high-throughput technologies. However, it is still necessary to validate the most promising markers and the standardization of procedures that will lead to specific clinical applications.

**Keywords:** biomarker, detection, lung cancer, diagnosis

## Introduction

Lung cancer is a global public health concern. The average five-year lung cancer survival rate in Europe is approximately 15%.<sup>1</sup> More people die from lung cancer than from breast, colon, and prostate cancer combined.<sup>2</sup> Nevertheless, the five-year survival rate in early-stage, operable, non-small cell lung cancer (NSCLC) is approximately 50%–70%. The five-year survival rate drops to 2%–5% for patients whose cancers are diagnosed after their tumors have spread distantly.<sup>3</sup> At present, the diagnosis of lung cancer is primarily based on symptoms (eg, cough, chest pain, hemoptysis, shortness of breath), and detection often occurs when curative intervention (ie, surgery) is no longer possible.

Although early detection can save lives, screening tests for high-risk individuals using sputum cytology or chest X-rays have not resulted in improvements in disease-specific survival.<sup>4,5</sup> Patients at risk for lung cancer may have subclinical disease for years before presentation, and until now, no validated model that includes molecular biomarkers of cancer risk have been developed. The clinical challenge, therefore, is to develop a non-invasive approach based on molecular biomarkers that may significantly improve the assessment of risk, early diagnosis, and application of chemoprevention for lung cancer.

This review presents and discusses the most recent advances in early detection and molecular diagnostic biomarkers for the detection of lung cancer, including an overview of the different matrices with which these biomarkers could be analyzed.

Correspondence: Carlos Camps  
Servicio de Oncología Médica, Hospital General Universitario de Valencia, Av. Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain  
Tel +34 961 972 151  
Fax +34 961 972 123  
Email [camps\\_car@gva.es](mailto:camps_car@gva.es)

## Early detection of lung cancer: the role of CT screening

Low-dose chest computed tomography (CT) scans are proven to be effective tools for the detection of early-stage resectable diseases. Several Phase 2 non-randomized trials of CT screening of high-risk individuals (current or former smokers) have shown that CT screening detects small size lung cancers of 12–15 mm in diameter. When these results are compared with those of a validated control group, CT scans detected three times more lung cancer than would be expected.<sup>6–8</sup>

The results from the National Lung Screening Trial (NLST, the largest randomized trial) were published recently. This study enrolled 53,454 persons at high risk for lung cancer in order to determine the real impact of screening with low-dose CT screening on lung cancer mortality at the population level. The participants were randomly assigned to undergo three annual screenings with either low-dose CT or single-view chest X-ray. The results of the NLST show a 20.0% decrease in mortality from lung cancer in the low-dose CT compared with the chest X-ray. Additionally, a 6.7% overall mortality reduction was observed in the CT group.<sup>9</sup> Conversely, low-dose CT screening was associated with a high rate of false positive results. Two other harmful effects of CT screening that should be considered are over-diagnosis and the association of low-dose CT with the development of radiation induced cancers (effects that could not be measured directly and must be assessed in future analyses). Given these results, the potential use of CT as a lung-cancer screening tool is still a matter of debate.

Due to the contentious results of the image-based screening programs, there is increasing interest in the development of risk prediction models that incorporate genetic and molecular biomarkers for the precise and accurate estimation of risks and are focused on the use of noninvasive or minimally invasive samples, such as blood, sputum, or exhaled breath.

## Molecular biomarkers

A biomarker is defined as a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic/pharmacodynamic responses to a therapeutic intervention.<sup>10</sup> An individual marker may serve more than one purpose and, therefore, can fall into more than one category. In addition, a single biomarker may have different categorizations across tumor types and/or stages of the disease.<sup>11</sup> The ideal cancer biomarker must be useful for all purposes (diagnosis,

prognosis, or the prediction of pharmacological response) and should also be easy to obtain, inexpensive, easy to perform, accurate, and highly informative.

New technologies, including pharmacogenomics, proteomics, metabolomics, and molecular imaging have been introduced in clinical settings and may potentially offer early diagnosis, accurate characterization of the histological subtype of NSCLC, and insight into disease prognosis and response to therapy. However, these techniques are in early development and considerable efforts to standardize them are necessary. Recently, Hanansh et al reviewed the emerging lung cancer serum biomarkers including proteins, DNA methylation patterns, autoantibodies, microRNAs, circulating tumor cells (CTCs), cell-free DNA, and several metabolites.<sup>12</sup> Table 1 summarizes some relevant studies in the field of biomarkers for lung cancer detection and shows the wide range of specimens, type of biomarkers and detection methods that have been used. An overview of the most recent publications in the area of early diagnosis biomarkers shows that the focus in cancer biomarkers has shifted from searching for single biomarkers to analyzing combined biomarkers, which seems to be more effective in decreasing false positives and increasing detection rates. However, at this time, there are no single or combined validated molecular biomarkers for the early detection of lung cancer despite the considerable number of investigations that have been carried out with this purpose (Table 1).

## Selection of the analytical matrix: the biological specimen

An important pre-analytic issue is choosing the “correct” analytical matrix in which to find new biomarkers. A good biomarker must be detectable in clinically accessible material; therefore, there is an increasing interest in the development of molecular-based minimally- or non-invasive screening methods. Fluid biomarkers include a variety of components found in blood, urine, or other fluids that may reflect the presence of a tumor in the body.<sup>13</sup>

The aim of early lung cancer diagnosis is to detect molecular biomarkers in non-invasive biological specimens before symptoms arise.

## Tissue bronchoscopy

Bronchoscopy, particularly with the help of techniques such as auto-fluorescence bronchoscopy (AFB) and narrow-band imaging, is a suitable technique for detecting preinvasive lesions and early-stage lung cancer in the central airways that cannot be detected by CT technology.<sup>14</sup> In addition,

several studies have demonstrated that the use of fluorescence in situ hybridization (FISH) testing for the detection of chromosomal abnormalities is significantly more sensitive than conventional cytology for detecting lung cancer in bronchoscopically obtained bronchial brushing specimens; however, this result was achieved with an increase in false positive diagnoses.<sup>15-18</sup>

Other studies show similar results that demonstrate how equivocal cytology in lung cancer diagnosis can be overcome with additional methods on the same specimen (ie, slide). Adjuvant FISH or DNA-image cytometry in cytologically equivocal diagnoses improves diagnostic accuracy at comparable rates.<sup>19</sup> Spira et al have identified an airway gene-expression biomarker that may be useful as a screening tool for the evaluation of smokers with suspected lung cancer. They performed gene-expression profiling on histologically normal upper airway epithelial cells obtained at the time of bronchoscopy, with sufficient quantities of high quality RNA for microarray studies from 152 of 208 samples. Their data suggest that combining cytopathology with the gene-expression biomarker improves the diagnostic sensitivity of the overall bronchoscopy procedure from 53% to 95%.<sup>20</sup>

AFB biopsies were also useful for analyzing microRNA expression by qPCR, allowing to assess different microRNA patterns during the successive steps of bronchial carcinogenesis.<sup>21</sup>

## Blood samples

The rich content of diverse molecular and cellular elements in blood, which gives information about the health status of an individual, makes it an ideal compartment in which to develop non-invasive diagnostics for cancer. Hanash et al recently reviewed the role of blood-borne biomarkers in cancer screening; this role could be extended from general population risk assessment to treatment response evaluation and recurrence monitoring.<sup>12</sup>

Blood samples comprise a complex matrix composed of a cellular fraction and serum or plasma. CTCs and macromolecules such as lipids, proteins, RNA, microRNA, and DNA that originate from tumor cells can be found in blood. In addition to CTCs, other circulating cells are currently being explored as sources of biomarkers such as immune, stromal, and endothelial cells.<sup>13</sup>

The first detection of cell-free nucleic acids originating from tumor cells and circulating in the serum or plasma of cancer patients, including lung cancer, was reported in 1997.<sup>22</sup> Several case-control studies have reported higher levels of circulating DNA in patients' blood than in normal

healthy controls, showing that DNA may be an important risk factor for the presence of illness and a prognostic index in the follow-up procedure (reviewed by Bremnes et al).<sup>23</sup> Interestingly, Sozzi et al were able to discriminate NSCLC patients from age-, sex-, and smoking-matched controls according to the amount of circulating plasma DNA, which was determined through the use of real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) amplification of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT).<sup>24</sup> Since then, several studies have assessed varying concentrations of free circulating DNA using diverse data analysis methods or laboratory procedures that have resulted in significant differences between lung cancer patients and controls.<sup>24-27</sup> In contrast to these studies, Tamkovich et al found no significant differences between the amount of DNA in plasma samples of lung cancer patients and healthy subjects.<sup>28</sup> In general, the vast majority of studies show that higher levels of circulating DNA can be detected in patients with lung cancer compared with disease-free smokers and control subjects, which suggests that the analysis of this biomarker may represent a new non-invasive approach for the early detection of lung cancer.

In terms of circulating nucleic acids, it is also worth considering the value of the isolation and characterization of circulating tumor DNA because a correlation between the detection of molecular alterations (genetic and epigenetic) in the circulating nucleic acids and lung tumor DNA has been demonstrated.<sup>29-31</sup>

Circulating cell-free RNA and miRNA as well as exosomal miRNA content has also been identified as a source of biomarkers for early detection in lung cancer patients.<sup>32-34</sup> The usefulness of circulating nucleic acid detection in plasma or serum for the early detection of lung cancer has been extensively assessed, but the results are still inconsistent due to the high rate of false negative results (the absence of circulating nucleic acids does not correlate with the absence of cancer).<sup>35</sup>

Recent microarray studies have identified additional early detection signatures using samples from peripheral blood. Showe et al demonstrated the feasibility of using the PBMC gene expression signature to identify early-stage NSCLC in at-risk populations.<sup>36</sup>

The use of blood samples for tumor protein quantification is another point to be addressed in the development of biomarkers for the early detection of lung cancer. Some proteomics biomarkers of lung cancer, such as carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratin-19 fragment (CYFRA), or neuron-specific enolase (NSE) are clinically available, while others (serum amyloid A –SAA-, haptoglobin- $\alpha$ 2, or Apo A-1)<sup>37</sup> still need

further validation and are not recommended for clinical diagnosis.

Another interesting approach is the detection and characterization of CTCs, which offers new perspectives for researchers. Several available CTC detection platforms were verified in clinical settings that strongly suggest that CTC detection has enormous potential to assist in malignancy diagnosis, estimating prognosis, and monitoring disease recurrence and responses to anticancer therapy. Tanaka et al evaluated the potential of CTC detection as a diagnostic parameter to distinguish malignant from benign lung disease. They found that the CTC count was significantly higher in lung cancer patients compared with nonmalignant patients, but the test showed a low sensitivity for detecting CTCs.<sup>38</sup> A novel microfluidic platform was recently developed that allows for the isolation of high quantities of rare CTCs. A pilot study using this technology showed that CTCs were detected in most blood samples taken from patients with a variety of malignant tumors, including lung cancer.<sup>39</sup> Therefore, comparative studies are still necessary to clarify the appropriate methodology for lung CTC detection, with the aim of improving early diagnosis, monitoring the disease, and genotyping tumors.

## Exhaled breath condensate

Exhaled breath condensate (EBC) is a fluid from the airways that can be collected by means of an easy, completely non-invasive, and repeatable procedure that is well accepted by patients. EBC contains both volatile and non-volatile compounds, including cytokines, proteins, and DNA.<sup>40</sup> The analysis of exhaled air for volatile organic compounds (VOCs) shows that there is a pattern of VOCs that distinguishes lung cancer patients.<sup>41–44</sup> Even when most VOCs in the cancer patients are higher at baseline compared to the controls, this difference is still evident after surgery.<sup>42</sup> Therefore, exhaled VOCs cannot be considered specific biomarkers for lung cancer, as they do not seem to be solely produced by tumor tissue, but rather by an epiphenomenon that accompanies lung cancer development.

Various studies have reported genetic changes in DNA found in EBC from lung cancer patients. Carpagnano et al demonstrated that the microsatellite alterations in DNA from the EBC and tumor tissue in NSCLC patients had an overlapping profile consisting of loss of heterozygosity and microsatellite instability.<sup>45</sup> In another study by Gessner et al, mutations were present in the EBC of patients with NSCLC, while no mutations were found in the EBC of the control subjects.<sup>46</sup>

All these findings support the suggestion that EBC may be an appropriate matrix for the non-invasive identification of early markers of NSCLC. On the other hand, a weakness of the use of EBC is that the collection devices can significantly affect the levels of biomarkers obtained; therefore, the values acquired from different devices may not be directly comparable.<sup>47</sup>

## Sputum

Sputum is another potentially attractive non-invasive source of biomarkers for lung cancer. Although it is unlikely that early-stage lung cancers will exfoliate detectable cancer cells in sputum, it is hypothesized that because of field tumorigenesis process, genetic or epigenetic changes in exfoliated cells may reflect an increased risk of lung cancer.<sup>48</sup> Consequently, many research groups have examined sputum as a matrix in which biomarkers can be determined. Byers et al studied cytologic atypia in a large cohort of smokers and former smokers with chronic obstructive lung diseases. They reported that sputum cytologic atypia is a marker for increased lung cancer risk and examined whether it might complement radiologic imaging in a combined approach to the early detection of lung cancer.<sup>49</sup> With the intention of improving the diagnostic accuracy of cytologic examination, additional molecular approaches have been investigated, such as gene-promoter methylation analysis<sup>50</sup> and FISH for chromosomal aneusomy using a four-target DNA FISH probe including EGFR, MYC, 5p15, and CEP6.<sup>51</sup>

Using sputum as starting material, Xie et al reported aberrant miRNA expression in this type of sample, which could be used as a marker for the early diagnosis of NSCLC,<sup>52</sup> especially in adenocarcinomas.<sup>53</sup> However, there are currently no definitive data indicating that sputum biomarkers are efficient for routine clinical applications to reliably predict individuals at risk of developing lung cancer or who are in the early stages of the disease.

## Strategies for the identification of early-detection lung cancer biomarkers

### Genomic/genetic approaches

Since human genome sequencing was completed, DNA has been widely studied for the detection of new biomarkers for many diseases. In lung cancer, genomic instability is frequently observed, which includes allelic loss and instability at loci on 3p (fragile histidine triad), 9p (*p16INK4A*), and 17p.<sup>54–56</sup> By analyzing a wide collection of lung adenocarcinomas through high resolution (250k) SNP arrays, Weir et al

**Table 1** Summary of relevant studies in the field of biomarkers for lung cancer detection

Reference	Sample type	Biomarker type	Detection method	Number of cases	Sensitivity/specificity (%)
Halling et al <sup>15</sup>	Bronchial brushing	Cytology and chromosomal abnormalities	Combined cytology and FISH	Patients = 89 Controls = 48 <sup>a</sup>	75/83 61/95
Spira et al <sup>20</sup>	Bronchial brushing	Gene expression	Microarrays	Primary dataset Patients = 60 Controls = 69 <sup>a</sup> Validation dataset Patients = 18 Controls = 17 <sup>a</sup>	80/84 83/76
Sozzi et al <sup>24</sup>	Blood	DNA	PCR	Patients = 100 Controls = 100	90/86 <sup>b</sup>
Tanaka et al <sup>38</sup>	Blood	CTC	CTC count	Patients = 125 Controls = 25 <sup>a</sup>	30.4/88.0 <sup>c</sup>
Patz et al <sup>79</sup>	Serum	Proteins	ELISA	Primary dataset Patients = 50 Controls = 50 Validation dataset Patients = 49 Controls = 48	89.3/84.7 77.8/75.4
Miura et al <sup>66</sup>	Serum	Gene expression	RT-PCR	Patients = 112 Controls = 80	89/72 <sup>d</sup> 71/80 <sup>e</sup>
Zheng et al <sup>33</sup>	Plasma	microRNAs	RT-PCR	Patients = 74 Controls = 68	81.33/86.76
Jantus-Lewintre et al <sup>83</sup>	Plasma	Proteins	ELISA	Patients = 432 Control = 89	74.5/85.7
Showe et al <sup>36</sup>	PBMC	Gene expression	Arrays	Primary dataset Patients = 137 Controls = 91 <sup>a</sup> Validation dataset Patients = 38 Controls = 17 <sup>a</sup>	91/80 76/82
Yu et al <sup>53</sup>	Sputum	microRNAs	RT-PCR	Primary dataset Patients = 36 Controls = 36 Validation dataset Patients = 64 Controls = 58	80.6/91.7 70.3/80
Xie et al <sup>52</sup>	Sputum	microRNAs	RT-PCR	Patients = 23 Controls = 17 <sup>a</sup>	69.7/100

**Notes:** <sup>a</sup>Control group consisted of patients without lung cancer; <sup>b</sup>Highest value obtained with a DNA concentration value of 9 ng/mL; <sup>c</sup>Cut-off CTC count  $\geq 1$ ; <sup>d</sup>Obtained with hTERT; <sup>e</sup>Obtained with EGFR.

**Abbreviations:** CTC, circulating tumor cell; EGFR, epidermal growth factor receptor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FISH, fluorescence in situ hybridization; hTERT, human telomerase reverse transcriptase gene; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

identified 57 significantly recurrent events in this type of tumor, but concluded that many of the genes involved in lung adenocarcinoma are yet to be discovered.<sup>57</sup> Twenty-six of the most prevalent somatic mutations in lung adenocarcinomas have recently been categorized. The most frequently mutated genes include tyrosine kinases, among them the EGFR homologue ERBB4; multiple ephrin receptor genes, notably EPHA3; vascular endothelial growth factor receptor, KDR; and NTRK genes.<sup>58</sup> The detection of these changes in DNA is considered a potential diagnostic tool, but due to the low frequency of alterations in the specific genes found in

biological samples, most of these studies obtained limited sensitivity and specificity.

Over last 5 years, next generation sequencing (NGS) methods have changed genomic analyses, thus providing a more accurate and sensitive detection technology for somatic mutations in tumors. NGS chemistries vary, but the results are similar: millions of sequencing reads of DNA templates are generated in parallel, gathering information of up to 200 Gb, while the read lengths for each DNA template are very short (35–500 bp) compared to the traditional Sanger sequencing method.<sup>59</sup> This technique can be applied to a

panel of relevant lung cancer related genes, a comprehensive assortment of signal transducers involved in the signaling of tumor cells, or even to the entire exome or genome of tumor cells. However, the massive amount of information derived from NGS will require impressive data processing tools and very careful interpretation to provide meaningful clinical information. On the other hand, the capacity to generate enormous amounts of information, together with the high specificity of NGS methods, offers a promising new avenue for discovery in many fields of research, especially in identifying molecular biomarkers for early detection and prognosis in lung cancer patients.

### Epigenomics/epigenetics

Epigenetics is defined as the study of the modifications of genes that are not coded in the DNA sequence itself and that are believed to be important in the etiology of diseases such as cancer. Unlike the DNA sequence, epigenetics may be influenced by the environment and may lead to alterations in the expression of genes through various epigenetic factors, such as methylation. In lung cancer cells, hypermethylation of certain regions is associated with promoter silencing of tumor suppressor genes and may serve as an early lung cancer-detection marker (reviewed by Tsou et al).<sup>60</sup> Elevated levels of methylated genes in plasma have been observed for RASSF1A, p16, APC, FIHT, RARbeta, MGMT, DAPK, tissue inhibitors of metalloproteinase 3 (TIMP-3), and SOCS1 and SOCS3.<sup>31,61</sup> In sputum, aberrant methylation of p16 and/or MGMT was found in all patients with squamous-cell lung carcinomas who were studied up to 3 years before clinical diagnosis.<sup>62</sup> Recently, DNA methylation of SHOX2 studied in bronchial lavage samples by differential methylation hybridization (DMH) showed the potential use of this gene in lung cancer detection, even in samples that contained no visible tumor cells.<sup>63</sup> This result was further confirmed in tumor and adjacent normal tissue samples of patients by analyzing SHOX2 DNA methylation levels.<sup>64</sup> Therefore, the analysis of methylation profiles in various types of biological specimens (plasma, serum, and sputum) appears to be a promising approach for the early diagnosis of lung cancer.

### Transcriptomics: messenger and micro-RNAs

The isolation of messenger RNA from body fluids such as plasma or serum still presents technical difficulties, which is reflected in the lower number of publications compared to those on DNA. Various approaches for transcriptomics

studies in blood samples from lung cancer patients have been performed. For instance, Xi et al<sup>65</sup> analyzed messenger RNA for the detection of CTCs in blood with a panel that included CK7, EGFR, SCCA, and SFTB. Miura et al<sup>66</sup> measured serum hTERT mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels in lung cancer patients using qPCR assays by observing that hTERT mRNA, especially when combined with EGFR mRNA, has adequate sensitivity and specificity as a biomarker of diagnosis and clinical stage. Gene expression profiles using RNA arrays have also been studied. As mentioned earlier, Showe et al found a gene expression signature in PBMC that distinguished early-stage NSCLC patients from those with non-malignant lung disease.<sup>36</sup>

Research on cancer biomarkers has recently focused on micro-RNAs (miRNAs), a type of non-transcribed short RNA that regulates the translation of mRNA by binding to sequences in the 3' untranslated region (3'UTR). Several studies have demonstrated the critical role that miRNAs play in cancer pathogenesis.<sup>67-69</sup> Several miRNAs have been detected in tissue, sputum, and peripheral blood in lung cancer patients with remarkable stability, which makes them attractive candidates as diagnostic biomarkers. Mascaux et al<sup>21</sup> have recently analyzed the miRNA expression profiling of biopsies obtained by fluorescence bronchoscopy using qPCR. They identified a set of miRNA that were differentially expressed in the successive stages of bronchial carcinogenesis that were also highly predictive of the histological grade. Furthermore, Jiang et al<sup>53</sup> describe a panel of seven miRNAs that are expressed differentially in lung adenocarcinomas compared with normal lung tissues. The combination of four of these miRNAs allowed for a distinction between patients with adenocarcinoma and normal subjects. Moreover, these miRNA could be detected in sputum samples by qPCR with high sensitivity and specificity.

The presence of miRNAs in plasma and serum samples has been widely studied. Endogenous plasma miRNAs are highly stable. They are resistant to incubation at 37°C, freeze-thaw cycles, and even to RNase activity.<sup>70,71</sup> The mechanisms by which miRNAs are protected are still unknown, although it has been hypothesized that they may be packaged inside exosomes or associated with other protective molecules.<sup>34,72</sup> Several studies carried out on plasma and serum have identified patterns of differential expression of miRNAs that allow lung cancer patients to be distinguished from cancer-free control subjects, even in patients with Stage I lung cancer.<sup>33,73-75</sup> In sum, these results support the hypothesis that

miRNA expression patterns may serve as biomarkers for the early diagnosis of lung cancer.

## Proteomics

Proteins are the real players in biomarking processes; therefore, they may have a significant advantage over genes in terms of biomarker discovery. Proteomics is becoming a useful tool for biomarker identification in different types of tumors due to the development of high-throughput platforms, which allow for the simultaneous detection of multiple proteins. Two approaches – the identification of individual proteins and protein expression profiling – have been suggested for the application of proteomics in biomarker detection. The role of some plasma proteins as diagnostic biomarkers has been further studied, and some are currently available in the clinical setting (eg, CEA, CYFRA, and NSE). The problem lies in the low specificity and/or sensitivity of these biomarkers, which means they are not recommended for clinical use.<sup>76–78</sup> Many additional proteins have recently been studied as potential diagnostic biomarkers in lung cancer. Patz et al<sup>79</sup> tested a panel of four serum proteins (CEA, retinol-binding protein,  $\alpha$ 1-antitrypsin, and squamous cell carcinoma antigen) in a matched case-control study including lung cancer patients, in which considerable specificity and sensitivity was obtained. The value of other serum proteins, such as amyloid A, haptoglobin- $\alpha$ 2, and a fragment of apolipoprotein A-1, as biomarkers has also been explored, although more clinical validation is needed.<sup>80–82</sup> Due to the importance of the angiogenic process in cancer, our group recently studied the diagnostic and prognostic implications of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in patients with advanced NSCLC, where we observed that both angiogenic markers exhibited higher plasma concentrations in patients compared to the age- and sex- matched controls with adequate specificity and sensitivity.<sup>83</sup>

Comparative protein profiling is another promising method for the detection of protein expression patterns. Advances in new analytical methods such as two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and mass spectrometry have made the simultaneous detection of multiple protein changes possible.<sup>84,85</sup> Tyan et al characterized a list of 1400 proteins in pleural effusion samples from lung adenocarcinoma patients by separating peptides and HPLC-ESI-MS/MS.<sup>86</sup> Furthermore, Soltermann et al isolated 170 glycoproteins that were also from pleural effusions, including several known lung cancer biomarkers such as CA125, CD44, and TTF.<sup>87</sup> These studies have some limitations due to their lack of independent validation. Moreover, they are not superior

to other lung cancer-diagnosis methods, despite the recent discovery of new biomarkers.

## Conclusion

Cancer biomarker research has recently experienced a remarkable growth in technology, which has resulted in biomarker discoveries from various “omics” including genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics. Several examples of novel candidate biomarkers for the early detection of lung cancer have emerged following this growth in technology. In conjunction with the use of non-invasively obtained samples, such as blood, sputum, or EBC, this technological growth represents a significant advance in the field of diagnostic biomarkers for lung cancer. The tasks ahead are to select the most promising markers (single or a panel) for the early detection of lung cancer in order to choose the correct specimen and novel methodology and to optimize and standardize procedures for the implementation of successful validation studies that will lead to specific clinical applications.

## Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

1. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46(4): 765–781.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69–90.
3. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007;2(8):706–714.
4. Melamed MR, Flehinger BJ. Screening for lung cancer. *Chest*. 1984;86(1):2–3.
5. Marcus PM, Bergstralh EJ, Zweig MH, Harris A, Offord KP, Fontana RS. Extended lung cancer incidence follow-up in the Mayo Lung Project and overdiagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(11):748–756.
6. Pastorino U, Bellomi M, Landoni C, et al. Early lung-cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2-year results. *Lancet*. 2003;362(9384):593–597.
7. Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, Pasmantier MW, Smith JP, Miettinen OS. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med*. 2006;355(17):1763–1771.
8. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, et al. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet*. 1999;354(9173):99–105.
9. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011; 365(5):395–409.
10. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
11. Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, et al. NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011;9(Suppl 5):S1–S32.

12. Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. Emerging molecular biomarkers – blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(3):142–150.
13. Martin KJ, Fournier MV, Reddy GP, Pardee AB. A need for basic research on fluid-based early detection biomarkers. *Cancer Res*. 2010;70(13):5203–5206.
14. McWilliams A, Lam B, Sutedja T. Early proximal lung cancer diagnosis and treatment. *Eur Respir J*. 2009;33(3):656–665.
15. Halling KC, Rickman OB, Kipp BR, Harwood AR, Doerr CH, Jett JR. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. *Chest*. 2006;130(3):694–701.
16. Voss JS, Kipp BR, Halling KC, et al. Fluorescence in situ hybridization testing algorithm improves lung cancer detection in bronchial brushing specimens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(5):478–485.
17. Bubendorf L, Muller P, Joos L, et al. Multitarget FISH analysis in the diagnosis of lung cancer. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(4):516–523.
18. Massion PP, Zou Y, Uner H, et al. Recurrent genomic gains in preinvasive lesions as a biomarker of risk for lung cancer. *PLoS One*. 2009;4(6):e5611.
19. Schramm M, Wrobel C, Born I, et al. Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. *Cancer Cytopathol*. 2011;119(3):177–192.
20. Spira A, Beane JE, Shah V, et al. Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. *Nat Med*. 2007;13(3):361–366.
21. Mascaux C, Laes JF, Anthoine G, et al. Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis. *Eur Respir J*. 2009;33(2):352–359.
22. Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science*. 1997;278(5340):1054–1059.
23. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer*. 2005;49(1):1–12.
24. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3902–3908.
25. Paci M, Maramotti S, Bellesia E, et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009;64(1):92–97.
26. Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):286–290.
27. Yoon KA, Park S, Lee SH, Kim JH, Lee JS. Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *J Mol Diagn*. 2009;11(3):182–185.
28. Tamkovich SN, Litviakov NV, Bryzgunova OE, et al. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1137:214–217.
29. Andriani F, Conte D, Mastrangelo T, et al. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer*. 2004;108(1):91–96.
30. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1219–1225.
31. Ostrow KL, Hoque MO, Loyo M, et al. Molecular analysis of plasma DNA for the early detection of lung cancer by quantitative methylation-specific PCR. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3463–3472.
32. Mitas M, Hoover L, Silvestri G, et al. Lunx is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood [corrected]. *J Mol Diagn*. 2003;5(4):237–242.
33. Zheng D, Haddadin S, Wang Y, et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(6):575–586.
34. Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2009;10(1):42–46.
35. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):181–232.
36. Showe MK, Vachani A, Kossenkov AV, et al. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells can distinguish patients with non-small cell lung cancer from patients with nonmalignant lung disease. *Cancer Res*. 2009;69(24):9202–9210.
37. Sung HJ, Cho JY. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB Rep*. 2008;41(9):615–625.
38. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6980–6986.
39. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235–1239.
40. Chan HP, Lewis C, Thomas PS. Exhaled breath analysis: novel approach for early detection of lung cancer. *Lung Cancer*. 2009;63(2):164–168.
41. Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, et al. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest*. 2003;123(6):2115–2123.
42. Poli D, Carbognani P, Corradi M, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respir Res*. 2005;6:71.
43. Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, et al. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. *BMC Cancer*. 2009;9:348.
44. Ligor M, Ligor T, Bajtarevic A, et al. Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(5):550–560.
45. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, et al. 3p microsatellite signature in exhaled breath condensate and tumor tissue of patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(3):337–341.
46. Gessner C, Kuhn H, Toepfer K, Hammerschmidt S, Schauer J, Wirtz H. Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2004;43(2):215–222.
47. Liu J, Conrad DH, Chow S, Tran VH, Yates DH, Thomas PS. Collection devices influence the constituents of exhaled breath condensate. *Eur Respir J*. 2007;30(4):807–808.
48. Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):707–717.
49. Byers T, Wolf HJ, Franklin WA, et al. Sputum cytologic atypia predicts incident lung cancer: defining latency and histologic specificity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(1):158–162.
50. Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res*. 2006;66(6):3338–3344.
51. Varella-Garcia M, Schulte AP, Wolf HJ, et al. The detection of chromosomal aneusomy by fluorescence in situ hybridization in sputum predicts lung cancer incidence. *Cancer Prev Res*. 2010;3(4):447–453.
52. Xie Y, Todd NW, Liu Z, et al. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;67(2):170–176.
53. Yu L, Todd NW, Xing L, et al. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2870–2878.
54. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*. 1996;85(1):17–26.
55. Mao L, Lee JS, Kurie JM, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(12):857–862.
56. Wistuba II, Lam S, Behrens C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(18):1366–1373.

57. Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2007;450(7171):893–898.
58. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455(7216):1069–1075.
59. Natrajan R, Reis-Filho JS. Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11(4):425–444.
60. Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene*. 2002;21(35):5450–5461.
61. Hoque MO, Kim MS, Ostrow KL, et al. Genome-wide promoter analysis uncovers portions of the cancer methylome. *Cancer Res*. 2008;68(8):2661–2670.
62. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res*. 2000;60(21):5954–5958.
63. Schmidt B, Liebenberg V, Dietrich D, et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer*. 2010;10:600.
64. Schneider KU, Dietrich D, Fleischhacker M, et al. Correlation of SHOX2 gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors. *BMC Cancer*. 2011;11:102.
65. Xi L, Nicastri DG, El-Hefnawy T, Hughes SJ, Luketich JD, Godfrey TE. Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers. *Clin Chem*. 2007;53(7):1206–1215.
66. Miura N, Nakamura H, Sato R, et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci*. 2006;97(12):1366–1373.
67. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005;435(7043):839–843.
68. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259–269.
69. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2006;94(6):776–780.
70. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513–10518.
71. Shen J, Todd NW, Zhang H, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest*. 2011;91(4):579–587.
72. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(6):703–711.
73. Shen J, Liu Z, Todd NW, et al. Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers. *BMC Cancer*. 2011;11:374.
74. Boeri M, Verri C, Conte D, et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9):3713–3718.
75. Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ. miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(3):482–488.
76. Kulpa J, Wojcik E, Radkowski A, Kolodziejewski L, Stasik Z, CYFRA 21-1, TPA-M, TPS, SCC-Ag and CEA in patients with squamous cell lung cancer and in chemical industry workers as a reference group. *Anticancer Res*. 2000;20(6D):5035–5040.
77. Kulpa J, Wojcik E, Reinfuss M, Kolodziejewski L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem*. 2002;48(11):1931–1937.
78. Bonner JA, Sloan JA, Rowland KM, et al. Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6(2):597–601.
79. Patz EF Jr, Campa MJ, Gottlin EB, Kusmartseva I, Guan XR, Herndon JE. Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(35):5578–5583.
80. Cho WC, Yip TT, Yip C, et al. Identification of serum amyloid A protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling. *Clin Cancer Res*. 2004;10(Pt 1):43–52.
81. Maciel CM, Junqueira M, Paschoal ME, et al. Differential proteomic serum pattern of low molecular weight proteins expressed by adenocarcinoma lung cancer patients. *J Exp Ther Oncol*. 2005;5(1):31–38.
82. Huang LJ, Chen SX, Huang Y, et al. Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase as a novel serum markers of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006;54(1):87–94.
83. Jantus-Lewintre E, Sanmartin E, Sirera R, et al. Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: Diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC. *Lung Cancer*. 2011;74(2):326–331.
84. Han KQ, Huang G, Gao CF, et al. Identification of lung cancer patients by serum protein profiling using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Am J Clin Oncol*. 2008;31(2):133–139.
85. Sidransky D, Irizarry R, Califano JA, et al. Serum protein MALDI profiling to distinguish upper aerodigestive tract cancer patients from control subjects. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(22):1711–1717.
86. Tyan YC, Wu HY, Lai WW, Su WC, Liao PC. Proteomic profiling of human pleural effusion using two-dimensional nano liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2005;4(4):1274–1286.
87. Soltermann A, Ossola R, Kilgus-Hawelski S, et al. N-glycoprotein profiling of lung adenocarcinoma pleural effusions by shotgun proteomics. *Cancer*. 2008;114(2):124–133.

## Lung Cancer: Targets and Therapy

### Publish your work in this journal

Lung Cancer: Targets and Therapy is an international, peer-reviewed, open access journal focusing on lung cancer research, identification of therapeutic targets and the optimal use of preventative and integrated treatment interventions to achieve improved outcomes, enhanced survival and quality of life for the cancer patient. Specific topics covered in the journal include:

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/lung-cancer-targets--therapy-journal>

Epidemiology, detection and screening; Cellular research and biomarkers; Identification of biotargets and agents with novel mechanisms of action; Optimal clinical use of existing anticancer agents, including combination therapies; Radiation and surgery; Palliative care; Patient adherence, quality of life, satisfaction; Health economic evaluations.



**TITLE: A genetic signature combining the tissue expression of three angiogenic factors is a prognostic marker in early-stage NSCLC**

Elena Sanmartín, MSc <sup>1,†</sup>, Rafael Sirera, PhD <sup>2,†</sup>, Marta Usó, MSc <sup>1</sup>, Ana Blasco, MD <sup>3</sup>, Sandra Gallach, MSc <sup>1</sup>, Santiago Figueroa, MD <sup>4</sup>, Nieves Martínez, MD <sup>3</sup>, Cristina Hernando, MD <sup>3</sup>, Antonio Honguero, MD, PhD <sup>5</sup>, Miguel Martorell, MD, PhD <sup>6</sup>, Ricardo Guijarro, MD, PhD <sup>4</sup>, Eloisa Jantus-Lewintre, PhD <sup>1,‡</sup>, Rafael Rosell, MD, PhD <sup>7</sup>, Carlos Camps, MD, PhD <sup>1,3,8</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology Laboratory, Fundación Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain

<sup>3</sup>Medical Oncology Department, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>4</sup>Department of Thoracic Surgery, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>5</sup>Department of Thoracic Surgery, Hospital General Universitario de Albacete, Albacete, Spain

<sup>6</sup>Department of Pathology, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>7</sup>Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>8</sup>Department of Medicine, Universitat de Valencia, Valencia, Spain

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work

**<sup>‡</sup>Corresponding author:**

Eloisa Jantus-Lewintre, PhD

Molecular Oncology Laboratory

Fundación Investigación, Hospital General Universitario de Valencia

Av. Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain

Tel: 961 972 000, ext. 52050 ; Fax: 961 972 151; E-mail: [jantus\\_elo@gva.es](mailto:jantus_elo@gva.es)

**Grant support:** This study was partially supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI06/1041 and PS09/1149), Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD06/0020/1024), and FEDER. None of the funding agencies were involved in the design and conduct, data management and analysis, manuscript preparation and review, or decision to submit.

**Conflict of interest:**

The authors disclose no potential conflicts of interest

## **Abstract**

*Introduction:* Angiogenesis and lymphangiogenesis are key mechanisms for tumor growth and dissemination, and are mainly regulated by the vascular endothelial growth factor (VEGF) family of ligands and receptors. The aim of this study was to analyze the mRNA expression of angiogenic markers in patients with resectable non-small cell lung cancer (NSCLC) and to correlate it with clinico-pathological variables and prognosis.

*Methods:* RNA was obtained from tumor and normal lung specimens from 175 NSCLC patients. Quantitative PCR (RTqPCR) was performed to assess the expression of HIF1-A, PIGF, VEGF-A, VEGF-A<sub>165b</sub>, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1 and NRP-2. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

*Results:* We found that tumor samples had higher expression of PIGF and lower expression of VEGF-D, VEGFR-2 and VEGFR-3 compared to normal tissue. The survival analyses revealed that patients with higher expression levels of PIGF or VEGF-A, and those with lower expression levels of VEGF-B or VEGF-D had significantly reduced time to progression (TTP) and overall survival (OS). The combination of high VEGF-A, low VEGF-B and low VEGF-D is an independent prognostic factor for both TTP and OS.

*Conclusions:* VEGF family members have a crucial role in the prognosis of NSCLC. The analysis of the combined expression of these markers allows us to obtain a genetic signature that could better distinguish patients with different outcomes in early-stage NSCLC. Furthermore, this analysis allows better characterization of patients with worse prognosis who could be candidates for targeted therapies.

**Keywords:** VEGF; angiogenesis; prognostic; NSCLC; biomarkers

## Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death and the most commonly diagnosed form of cancer, with a worldwide incidence of more than a million new cases annually [1]. The average 5-year lung cancer survival rate is approximately 15 %.[2]. Surgery is a potentially curative measure in early-stage non-small cell lung cancer (NSCLC), however, only 40-50% of patients that are amenable to radical surgery are cured due to the high risk of disease recurrence after surgery [3].

Angiogenesis and lymphangiogenesis are very complex, tightly regulated and multistep processes which are central in tumor growth and metastatic spread. The VEGF family of ligands and receptors play an essential role throughout these processes [4]. This VEGF family includes five ligands that have been described in humans: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and placental growth factor (PlGF). The signaling process is mediated by high affinity binding to three tyrosine-kinase receptors: VEGFR1 (also known as Flt1), VEGFR-2 (KDR/Flk1) and VEGFR3 (Flt4) [5].

Hypoxia is a potent inducer of VEGF-A, the major mediator of tumor angiogenesis. VEGF-A has multiple isoforms generated by alternative splicing, with VEGF<sub>165</sub> being the most common isoform. VEGF-A exerts its pro-angiogenic effect by activating VEGFR-1 or VEGFR-2. VEGF-A has approximately 10 times higher affinity for VEGFR-1, but because its signal transduction properties are lower, VEGF-A signaling occurs mainly through VEGFR-2 [6]. On the other hand, PlGF and VEGF-B mediate their signaling by binding to VEGFR-1 while VEGF-C and VEGF-D interact with VEGFR-2 and VEGFR-3<sup>5</sup>. In adults, the receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 are expressed mainly in the vascular endothelium, whereas VEGFR-3 is restricted largely to the lymphatic endothelium.

Additionally, neuropilins (NRP), membrane glycoprotein receptors without kinase activity, are another group of receptors related to VEGF. Neuropilins are thought to act primarily as co-receptors, enhancing the binding of VEGF-A to VEGFR-2 and are expressed in some tumor and endothelial cells. Recent evidence indicates that at least *in vitro*, NRP-1 can mediate signaling activity on its own, independent of VEGFR-2, leading to endothelial cell migration but not proliferation [7].

Since the first published paper by Mattern *et al.* in 1997 regarding the expression of VEGF in lung cancer, which was found to be associated with microvessel density, numerous studies have been conducted regarding the association of VEGF/VEGFR expression with prognosis in NSCLC [8, 9]. The expression or over-expression of VEGF has been reported in 60% of NSCLCs, with many of the studies indicating a positive correlation between the expression of VEGF and

tumor vascularization [10]. According to the meta-analysis by Zhan in 2009, VEGF over-expression has an unfavorable impact on the survival of patients with NSCLC, with worse prognosis in the adenocarcinoma (ADC) subtype [11], while the prognostic relevance of other family members is still contentious [12]. Recently, published results of an immunohistochemical (IHC) analysis in early-stage NSCLC patients revealed the importance of the combination of markers for studying prognosis. This study found that the combination of high VEGF-A, VEGFR-1 and VEGFR-2 expression was associated with good prognosis in squamous cell carcinoma patients (SCC) [13].

The relationship between the levels of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 is also interesting in relation to the spreading of the tumor. The expression level of VEGF-C was found to be correlated with lymphatic invasion [14, 15]. However, the correlation between the expression of VEGF-D and metastasis is more controversial in the literature [16-20]. Therefore, a more complete view of the implications and interactions of the key elements of the VEGF family pathway is needed to approach the study of angiogenesis and lymphangiogenesis in NSCLC prognosis.

Thus, we aimed to analyze, for the first time, the mRNA expression levels of all VEGF ligands, receptors and co-receptors, as well as HIF1-A, using quantitative PCR (RT-qPCR), a highly sensitive and reproducible technique, in a large cohort of resectable NSCLC patients to establish expression profiles associated with prognosis for this disease to distinguish patients with the highest risk of relapse.

## Materials and Methods

### *Patients and tissue samples*

Between 2004 and 2011, 175 resectable NSCLC patients from the General University Hospital of Valencia were recruited for this retrospective study. The eligibility criteria included a diagnosis of early-stage NSCLC and the lack of any previous treatment. All of the individuals provided informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and applicable local regulatory requirements and laws. The institutional ethical review board approved the study protocol.

Patients' tumor and adjacent normal lung specimens were obtained at the time of the surgery and were immersed in RNAlater<sup>®</sup> (Applied Biosystems, USA) to avoid degradation of RNA. The samples were subsequently sent to the reference laboratory and were frozen at -80°C until the moment of analysis.

### *Isolation of mRNA*

RNA isolation from the tumor and normal tissue specimens was performed by using TriReagent<sup>®</sup> (Sigma, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the samples were homogenized using Tissue Lyser<sup>®</sup> (Qiagen, Germany), and chloroform was added to separate the aqueous phase containing the RNA. Nucleic acids were precipitated using isopropanol and washed with ethanol. The RNA was resuspended in Nuclease-Free Water<sup>®</sup> (Qiagen, Germany) and stored at -80°C until further analysis. The obtained mRNA was quantified using a nano-spectrophotometer (NanoDrop 2000C, Thermo Fisher Scientific, USA), and the integrity was assessed with a bioanalyzer by microfluidics-based platform (Agilent 2100, Agilent Technologies, Germany).

### *Reverse Transcription and Real-Time quantitative PCR*

Reverse transcription reactions (RT) were performed from 1.0 µg of total RNA to synthesize cDNA using random hexanucleotides and the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit<sup>®</sup> (Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's instructions. The thermal cycling conditions were as follows: 10 minutes at 25°C, 120 minutes at 37°C and 5 seconds at 85°C.

Relative gene expression of angio- and lymphangiogenic-related genes (*VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *PIGF*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, *VEGFR-3*, *NRP-1*, *NRP-2*, *HIF-1A* and *VEGF-A<sub>165b</sub>*) were quantized by real-time quantitative PCR (qPCR) with assays based on hydrolysis probes and using 1 µl of cDNA from the previous RT reaction, Universal Master Mix (Applied Biosystems) and TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay (Applied Biosystems), in a 5 µl final volume of reaction.

Amplification of the  $\beta$ -glucuronidase gene (GUSB) as an endogenous gene was performed in all cases to normalize the gene expression values. The primer and probe sets used for specific amplification of the selected genes are shown in Supplemental Digital Content 1. The thermal cycling parameters were as follows: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. Each sample was run in duplicate and the mean value of the replicates for each sample was calculated and expressed as  $C_q$  (Quantification cycle). Gene expression of the tumor samples of each patient was normalized against its normal sample as a control. For efficiency calculations, the relative standard curves for each target and reference gene were obtained using serially diluted cDNA prepared from a reference cDNA (qPCR Human Reference cDNA random-primed, Clontech, USA). Relative gene expression levels in test samples were expressed as the ratio of target gene expression / reference gene (GUSB) expression by using the Pfaffl formula [21].

#### *Statistical analysis*

Because the variables did not follow a normal distribution (determined by the Kolmogorov-Smirnov test), the comparisons and correlations with categorical variables were conducted using the non-parametric Mann-Whitney  $U$ -test and the Kruskal-Wallis test. The association between dichotomized variables was evaluated using the  $\chi^2$  test.

The overall survival (OS) and the time to progression (TTP) were calculated from the date of surgery up to the endpoint or last follow-up. The survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method, and the differences between the groups were assessed using the log-rank test. The Cox-regression analysis was used for multivariate analysis to identify independent prognostic factors. A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 15.0.

## Results

The most relevant demographic and clinico-pathological characteristics of the cohort of patients are shown in Table 1. The median age was 63 years, and 86.9% were male. The majority of patients were in the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)-PS=0 (72%). The most common histological subtype was SCC (47.4%), the majority of patients (52.6%) had stage I disease and 65.7% did not receive any postoperative treatment.

### *Relative gene expression*

We analyzed the relative expression levels of angio- and lymphangiogenic-related genes (*VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *PlGF*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, *VEGFR-3*, *NRP-1*, *NRP-2*, *HIF-1A* and *VEGF-A<sub>165b</sub>*) in 175 paired samples (tumor tissues and normal lung tissues from each patient). All of the analyzed genes could be amplified using the selected primers/probes.

PlGF was over-expressed in tumor tissue compared to normal tissue (2.76x), whereas VEGFR-2 (0.42x) and VEGFR-3 (0.42x) expression was lower in tumor compared to normal lung tissue. We also found a remarkably under-expression of VEGF-D (0.035x) in tumor samples.

### *Association between gene expression and clinico-pathological variables*

We examined the relationship between the expression levels of the analyzed genes and patients' demographics and clinico-pathological characteristics. We found that PlGF was more highly expressed in SCC (4.72x) than in ADC (1.95x) ( $p < 0.0001$ ). There were significant differences between patient gender and the expression of PlGF ( $p = 0.017$ ), VEGF-A ( $p = 0.018$ ), VEGFR-1 ( $p = 0.015$ ) and NRP-2 ( $p = 0.042$ ), where men had higher values than women for all of these markers. The expression of VEGF-D was lower in patients older than 65 years ( $p = 0.040$ ) and in more advanced stages (II-III vs. I) ( $p = 0.015$ ). Finally, patients with lymph node metastasis showed the lowest values in terms of relative expression of VEGF-D (0.023x) in comparison to patients who had no affected lymph nodes (0.039x), indicating a possible association between lymph node status and the levels of expression of VEGF-D ( $p = 0.083$ ).

### *Association between gene expression and survival*

Median follow-up was 22 months [range, 0.4-80.6 months]. We analyzed the prognosis of patients in relation to gene expression at two endpoints: TTP and OS. For this purpose, continuous variables were dichotomized as high ( $\geq$  median) and low ( $<$  median), using the median expression of each gene as a cutoff. A summary of the univariate analysis is shown in Supplemental Digital Content 2.

The univariate analysis showed that patients with high expression levels of PIGF had shorter TTP (30.1 months vs. NR [median not reached],  $p=0.027$ ) and shorter OS (42.6 months vs. NR,  $p=0.048$ ) than patients with low levels of PIGF (Figure 1A). Similarly, the expression levels of VEGF-A differentiates two groups with distinct prognoses, namely patients with high levels of VEGF-A were those having shorter TTP (21.1 months vs. NR,  $p=0.024$ ) and OS (42.9 months vs. NR,  $p=0.050$ ) (Figure 1B). The survival analysis, restricted to patients with ADC histology, showed the same prognostic differences for groups with VEGF-A high vs. low, but with greater statistical significance for OS ( $p=0.039$ ); while there were no significant differences in the group of SCC subtype.

Conversely, the survival analysis for VEGF-B showed an opposite effect, as patients with expression levels below the median had significantly worse prognosis in terms of TTP (22.1 months vs. NR;  $p=0.020$ ) and OS (27.9 months vs. NR;  $p=0.003$ ) than the group with high expression levels of this marker (Figure 1C). The analysis restricted to the SCC specimens also showed these differences but with greater statistical power for TTP ( $p=0.004$ ); while there are no significant differences for ADCs .

In the case of VEGF-D, lower levels of this marker were related to poor prognosis, as we found a trend to shorter TTP ( $p=0.135$ ) and OS (0.089) for patients with low expression levels compared to patients with high levels of VEGF-D. Although not significant, the Kaplan-Meier plots demonstrate this observation (Figure 1D). Additionally, there were no significant associations between TTP and OS and the levels of VEGF<sub>165b</sub>, VEGF-C, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1, NRP-2 and HIF-1A.

#### *Genetic angiogenic signature and survival*

According to these results, we considered the combination of markers in order to find angiogenic genetic signatures to better assess the prognosis of patients.

Thus, we combined PIGF, VEGF-A, and VEGF-B as well as VEGF-D because, although not statistically significant, VEGF-D allows the prognosis of patients to be clearly distinguished, as shown in Figure 1D. At this point, we first performed combinations of two variables, defined as the poor prognosis group in each case, which was characterized by combining the pattern of poor prognosis for two of these factors. Each of these combinations was compared with other possible combinations. The survival analysis showed that the following combinations, *VEGF-A/VEGF-B*, *VEGF-A/VEGF-D*, *VEGF-A/PIGF* and *PIGF/VEGF-B*, allow to differentiate groups with poor prognosis in TTP and OS with even greater significance than the individual analysis of each variable. We also analyzed combinations of three factors, and we found that the expression profiles of patient groups with the worst prognosis in TTP and OS are characterized

by high levels of VEGF-A and PIGF and low levels of VEGF-B ( $\uparrow$ VEGF-A/ $\uparrow$ PIGF/ $\downarrow$ VEGF-B) or by high levels of VEGF-A and low levels of both VEGF-B and VEGF-D ( $\uparrow$ VEGF-A/ $\downarrow$ VEGF-B/ $\downarrow$ VEGF-D) (see Figure 2 and Supplemental Digital Content 2).

Moreover, we contemplated the combination of the four markers (PIGF, VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D), but this combined variable was not better in terms of statistical significance compared to the combinations mentioned above.

#### *Multivariate Cox regression analysis*

To determine if any of the analyzed variables are independent prognostic factors for lung cancer in our cohort, multivariate analysis was performed according to the Cox regression method. Previously, we analyzed all of the clinical and pathological variables that may be related to the development of the disease by the Kaplan-Meier and Cox univariate analysis. The gene expression and clinico-pathological variables of significant value ( $p < 0.05$ ; see Supplemental Digital Content 2) were entered into the multivariate Cox regression analysis. Table 2 shows the results of the analysis. The independent prognostic variables according to the Cox regression model for TTP were tumor size and the combined expression of VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D (VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D). For OS, the multivariate analysis revealed that independent prognostic variables were tumor size, VEGF-B expression and the combined expression of VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D (VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D).

The subgroup of worse prognosis was represented by those patients which hold combined  $\uparrow$ VEGF-A/ $\downarrow$ VEGF-B/ $\downarrow$ VEGF-D compared with the subgroup with better prognosis (all other possible combinations). Of note, no significant differences in age, histological types, stage, ECOG-PS, gender and smoking status were noted between the two groups (Table 3). The same analysis was done in two subsets of patients, classified according to their post-operative treatment (patients not treated and patients receiving adjuvant chemo or radio/chemotherapy). None of the post-operative treatment regimens seems to influence in the observed differences in outcome when the combined expression of VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D was used as a prognostic biomarker, as shown in the figure of Supplemental Digital Content 3. These findings suggest that this genetic angiogenic signature is an interesting biomarker in early-stage NSCLC, which behaves independently on the treatment that patients received after lung cancer resection.

## Discussion

The processes of angiogenesis and lymphangiogenesis are early events in cancer disease, key factors that result in tumor growth and spread. The ligands and receptors of the VEGF family are the main regulators of these processes. Thus, the inhibition of the signaling pathways VEGF/VEGFR-2 and VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 appears to contribute to tumor regression (reviewed by Ferrara) [22] and has led to the production of therapeutic agents in humans. Recently, the addition of anti-angiogenic drugs to standard chemotherapy has proved to significantly increase the median survival rates of patients with lung cancer. But until now, there are no predictive biomarkers for anti-angiogenic agents [23]. In this regard, the use of marker's profiles based on angiogenic mediators as prognostic tools at the earliest stage of NSCLC could be of clinical interest for the selection of patients that could be eligible for induction or adjuvant targeted-therapies and for finding predictors of NSCLC.

For this purpose, in the present study, we investigated whether the expression of single angiogenic and lymphangiogenic markers, as well as the expression profiles or signatures, were associated with clinical features and prognosis in resectable NSCLC patients. We performed, for the first time, an expression analysis by RTqPCR of all members of the VEGF family and also included NRPs and HIF1-A for a more complete picture of the interrelationships among angio- and lymphangiogenic factors in early-stage NSCLC. RTqPCR is a specific and reproducible technique, which, in contrast to other methods such as IHC, does not need interobserver variability criteria.

The results of our study show that the tissue levels of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D and PlGF expression distinguish groups of patients with different prognoses for the disease. VEGF-A is the most studied angiogenic factor, and its expression or over-expression in tumors has been reported in approximately 60% of NSCLC (reviewed by Zhu) [10]. VEGF-A has been identified as a prognostic factor in most studies, and in addition, circulating levels of this marker have been extensively studied in relation to its potential diagnostic or predictive role [24, 25]. However, although an association between circulating VEGF-A levels and tumor response against some antiangiogenic therapies has been reported, conclusive data in survival prediction does not exist [26, 27]. In the present study, we did not find differences in VEGF-A mRNA expression levels between tumor and normal lung, but we reported that higher levels of VEGF-A are significantly related to poor prognosis. According to Zhan meta-analysis, patients with high VEGF-A expression and ADC histology show the worst prognosis in relation to patients with other histologies [11]. However, a novel splice variant of VEGF-A that could be associated with antiangiogenic properties (VEGF<sub>165b</sub>) has recently been identified [28]. Thus, we investigated

the role of the VEGF<sub>165b</sub> in our cohort of patients. The expression of VEGF<sub>165b</sub> was not significantly associated with outcome. Therefore, in concordance with *Das et al.* [29] in this study we could not find the inhibitory effect on tumor growth or the anti-angiogenic effect that other authors had reported for this splice variant [28, 30, 31].

There are fewer studies on VEGF -B, although it has also been found to be expressed in various tumor types [32], including lung cancer [19] and over-expressed compared to normal tissue in some of them [33]. This finding would suggest that VEGF-B can complement the role of other family members of VEGF in the promotion of tumor angiogenesis. However, data in the literature regarding its role in disease prognosis are scarce. *Mylona et al.* performing immunohistochemical studies found that the expression of VEGF-B was a marker of unfavorable prognosis in breast cancer patients with positive nodes [34]. However, our data indicate just the opposite, as in our cohort of NSCLC patients, high expression of VEGF-B correlated with better prognosis.

In this study, the mRNA expression level of PlGF was increased in tumors compared to normal tissue. This finding has also been reported in other tumors, such as colorectal, renal and breast cancer [35-39]. Conversely, other studies have found that low expression in some tumors was associated with methylation of the PlGF promoter [40]. Additionally, we found that over-expression of PlGF is even greater in the group of patients with SCC, although other authors found no significant difference [41-43]. In relation to these findings, *Woo et al.* also found differences in the expression level of PlGF in terms of tumor histology, being higher in SCLC than in NSCLC [44]. These differences in the expression of PlGF among histologies may contribute to the distinct biology of the disease. In fact, in recent years, many reports clearly indicate that histologic subtypes are biologically different in terms of gene expression, tumor response to therapy, drug toxicity, and clinical outcome, which suggest that these tumors may also have a potentially distinct response to inhibition of the VEGF pathway [13, 45-47]. Additionally, we have demonstrated that PlGF expression influences patient outcome, specifically by showing a relationship between high PlGF level and poorer outcomes, similar to the findings by other authors [35, 39, 43].

Regarding VEGF-D expression and as previously reported by several authors in lung and other cancers [18, 19, 48, 49], we found a marked under-expression of these gene in tumors compared to normal tissue (0.035x), in addition to a possible link between low VEGF-D expression and lymph node involvement. Several studies have investigated the relationship between the levels of both protein and mRNA of VEGF-C, VEGF-D and its receptor, VEGFR-3, in relation to the capacity of tumor dissemination. In this regard, VEGF-C expression has been correlated with poor prognosis [15] and with lymph node metastasis [14, 50, 51], while VEGF-D

expression and its correlation with metastasis or patient survival seems less clear in the literature or even contradictory [16-18, 20, 52-54]. It is important to note that our data indicate that the level of VEGF-D expression can clearly distinguish two groups of patients with different clinical outcomes, which could be related to a possible anti-metastatic effect of the downregulation of VEGF-D.

The interrelationships among the members of VEGF signaling pathway are complex, as the different members and isoforms of the family interact with each other, modulating their signaling in a synergistic and in certain cases, antagonistic manner. Considering this complexity, and based on the observed results, we decided to approach the analysis by studying the combined expression of these genes as a genetic signature to evaluate the prognosis of patients. Thus, we find that the combined variables for the expression of VEGF-A/VEGF-B, VEGF-A/VEGF-D, VEGF-A/PlGF, PlGF/VEGF-B and the combination of VEGF-A/VEGF-B/PlGF and VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D allow us to differentiate between different prognosis groups with greater statistical significance than individual analysis. It should be noted that according to the multivariate Cox analysis, the combined expression of VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D have independent prognostic values for TTP and that the expression of VEGF-B and, again, the combined expression of VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D are independent prognostic markers for OS. Moreover, the prognostic value of the combination of VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D is not influenced by adjuvant treatment of patients, since it holds even when we analyzed patients according to whether or not they received adjuvant therapy. Similarly, we found other approaches in the literature to understand these mechanisms by studying the expression profiles of several VEGF family members [13, 19, 24, 55].

Sands *et al.* studied the complex interaction of these angiogenic mediators in the hypoxic lung, and their results indicated that VEGF-B and PlGF can inhibit or enhance the action of VEGF-A in accordance with their specific concentrations [56]. Another study on the interaction of these factors was conducted by Moffat *et al.*, in which they generated cell lines that over- or under-expressed VEGF-A to study the changes in the levels of expression of other members of this family of ligands. The authors showed that under-expression of VEGF-A did not result in complete inhibition of angiogenesis and observed an increase in the expression of VEGF-D, which they state could be an alternative or secondary path toward angiogenesis [57]. Thus, considering the exposed results, we hypothesized that the major mediators in the angiogenic process would be VEGF-A and PlGF, as their high expression determines a poor prognosis. However, VEGF-B and VEGF-D may be acting as competitive agonists of VEGF-A and PlGF, but with less angiogenic and lymphangiogenic action, or even as antagonists or inhibitors of their action, as VEGF-B and VEGF-D can bind to the same receptors as VEGF-A and PlGF (VEGFR-1

and VEGFR-2, respectively). Therefore, the low levels of VEGF-B and VEGF-D that determine a poor prognosis in our patients may be allowing VEGF-A and PlGF to increase their action through the two receptors.

In conclusion, it seems that the best way to approach the study of angiogenic and/or lymphangiogenic markers is the study of the expression profiles of combined markers or gene signatures. We found that high expression of VEGF-A and/or PlGF in combination with low expression of VEGF-B and/or VEGF-D represents a phenotype of poor prognosis in early-stage NSCLC. Hence, the genetic signature of these markers provides us more information about the complex interplay of these factors in the regulation of such a mechanism and could allow better characterization of patients with strikingly different prognosis who may be candidates for targeted therapies. It will require further studies for validation our results as well as clinical trials in prospective cohorts to evaluate the prognostic and predictive potential of these biomarkers in relation to anti-angiogenic therapies.

## References

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
- [2] Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol* 2008;3:819-31.
- [3] Spiro SG, Tanner NT, Silvestri GA, et al. Lung cancer: progress in diagnosis, staging and therapy. *Respirology* 2010;15:44-50.
- [4] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
- [5] Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000;60:203-12.
- [6] Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-49.
- [7] Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 2005;3:1835-42.
- [8] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density. *Anticancer Res* 1997;17:2249-52.
- [9] Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: The prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51:143-58.
- [10] Zhu CQ, Shih W, Ling CH, et al. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 2006;59:790-800.
- [11] Zhan P, Wang J, Lv XJ, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol* 2009;4:1094-103.
- [12] Salgia R. Prognostic significance of angiogenesis and angiogenic growth factors in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011;117:3889-99.
- [13] Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M, et al. Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 2012;30:1129-36.
- [14] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7:192-8.
- [15] Pepper MS, Tille JC, Nisato R, et al. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res* 2003;314:167-77.

- [16] Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, et al. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2003;88:237-44.
- [17] Ko YH, Jung CK, Lee MA, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res Treat* 2008;40:133-40.
- [18] Maekawa S, Iwasaki A, Shirakusa T, et al. Correlation between lymph node metastasis and the expression of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 in T1 lung adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2007;27:3735-41.
- [19] Niki T, Iba S, Tokunou M, et al. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:2431-9.
- [20] Feng Y, Wang W, Hu J, et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D as significant markers for assessment of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Anat Rec (Hoboken)* 2010;293:802-12.
- [21] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- [22] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
- [23] Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-50.
- [24] Jantus-Lewintre E, Sanmartin E, Sirera R, et al. Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: Diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC. *Lung Cancer* 2011;74:326-31.
- [25] Reinmuth N, Thomas M, Meister M, et al. Current data on predictive markers for anti-angiogenic therapy in thoracic tumours. *Eur Respir J* 2010;36:915-24.
- [26] Dowlati A, Gray R, Sandler AB, et al. Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab--an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 2008;14:1407-12.
- [27] Hanrahan EO, Ryan AJ, Mann H, et al. Baseline vascular endothelial growth factor concentration as a potential predictive marker of benefit from vandetanib in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3600-9.
- [28] Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-31.
- [29] Das K, Zhao Y, Sugiono M, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor165b in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* 2007;25:317-21.

- [30] Woolard J, Wang WY, Bevan HS, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004;64:7822-35.
- [31] Manetti M, Guiducci S, Romano E, et al. Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 2011;109:e14-e26.
- [32] Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998;153:103-8.
- [33] Nash AD, Baca M, Wright C, et al. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther* 2006;19:61-9.
- [34] Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007;104:557-63.
- [35] Wei SC, Tsao PN, Yu SC, et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut* 2005;54:666-72.
- [36] Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, et al. The significance of placenta growth factor in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *Cancer Lett* 2004;213:73-82.
- [37] Matsumoto K, Suzuki K, Koike H, et al. Prognostic significance of plasma placental growth factor levels in renal cell cancer: an association with clinical characteristics and vascular endothelial growth factor levels. *Anticancer Res* 2003;23:4953-8.
- [38] Parr C, Watkins G, Boulton M, et al. Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2819-27.
- [39] Maae E, Olsen DA, Steffensen KD, et al. Prognostic impact of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor A in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133:257-65.
- [40] Xu L, Jain RK. Down-regulation of placenta growth factor by promoter hypermethylation in human lung and colon carcinoma. *Mol Cancer Res* 2007;5:873-80.
- [41] Ho MC, Chen CN, Lee H, et al. Placenta growth factor not vascular endothelial growth factor A or C can predict the early recurrence after radical resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2007;250:237-49.
- [42] Zhang L, Chen J, Ke Y, et al. Expression of Placenta growth factor (PIGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance. *World J Surg Oncol* 2005;3:68.
- [43] Cheng SJ, Lee JJ, Kok SH, et al. Expression of placenta growth factor: an independent factor for prediction of progression and prognosis of oral cancer. *Head Neck* 2010;32:1363-9.
- [44] Woo IS, Park MJ, Byun JH, et al. Expression of placental growth factor gene in lung cancer. *Tumour Biol* 2004;25:1-6.

- [45] Neal JW. Histology matters: individualizing treatment in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2010;15:3-5.
- [46] Wheatley-Price P, Blackhall F, Lee SM, et al. The influence of sex and histology on outcomes in non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of five randomized trials. *Ann Oncol* 2010;21:2023-8.
- [47] Langer CJ, Besse B, Gualberto A, et al. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:5311-20.
- [48] George ML, Tutton MG, Janssen F, et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001;3:420-7.
- [49] Charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 2001;92:556-68.
- [50] Saintigny P, Kambouchner M, Ly M, et al. Vascular endothelial growth factor-C and its receptor VEGFR-3 in non-small-cell lung cancer: concurrent expression in cancer cells from primary tumour and metastatic lymph node. *Lung Cancer* 2007;58:205-13.
- [51] Bo C, Xiaopeng D, Chuanliang P, et al. Expression of vascular endothelial growth factors C and D correlates with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009;57:291-4.
- [52] Carrillo de Santa PE, Arias FC, Caso PE, et al. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their receptors R1, R2, and R3 in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2009;115:1701-12.
- [53] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003;9:716-21.
- [54] White JD, Hewett PW, Kosuge D, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:1669-75.
- [55] Donnem T, Al Shibli K, Andersen S, et al. Combination of low vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)/VEGF receptor 2 expression and high lymphocyte infiltration is a strong and independent favorable prognostic factor in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2010;116:4318-25.
- [56] Sands M, Howell K, Costello CM, et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung. *Respir Res* 2011;12:17.
- [57] Moffat BA, Chen M, Kariaapper MS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A causes a paradoxical increase in tumor blood flow and up-regulation of VEGF-D. *Clin Cancer Res* 2006;12:1525-32.

### **Titles and Legends for Figures**

**Figure 1.** Kaplan–Meier plots for TTP and OS according to expression of (A) PlGF, (B) VEGF-A, (C) VEGF-B and (D) VEGF-D.

**Legend for Figure 1.** Abbreviations: PlGF, placental growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; TTP, time to progression; OS, overall survival.

**Figure 2.** Kaplan–Meier plots according to coexpression of (A) VEGF-A, PlGF and VEGF-B for TTP and (B) OS; and coexpression of (C) VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D for TTP and (D) OS.

**Legend for Figure 2.** Abbreviations: PlGF, placental growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; TTP, time to progression; OS, overall survival.

**Supplemental Digital Content 3.** Kaplan-Meier plots according to coexpression of VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D for TTP and OS in (A) postoperative treated patients and (B) no postoperative treated patients.

**Legend for Supplemental Digital Content 3.** Abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor; TTP, time to progression; OS, overall survival.

**List of Supplemental Digital Content**

Supplemental Digital Content 1.doc

Supplemental Digital Content 2.doc

Supplemental Digital Content 3.eps

**Table 1.** Characteristics and treatment of patients

	<b>N =175</b>	<b>%</b>
<b>Age</b> (median, range)	63 [26-85]	
<b>Gender</b>		
Male	152	86.9
Female	23	13.1
<b>Performance Status</b>		
PS = 0	126	72
PS = 1	47	26.9
PS = 2	2	1.1
<b>Histology</b>		
SCC	83	47.4
ADC	69	39.4
NSCLC NOS	23	13.2
<b>Stage</b>		
I	92	52.6
II	45	25.7
IIIA	38	21.7
<b>Smoking status</b>		
Current smoker	84	48
Former smoker	71	40.6
Non-smoker	20	11.4
<b>Postoperative treatment</b>		
No	115	65.7
Chemotherapy	38	21.7
Chemotherapy / Radiotherapy	22	12.6

**Abbreviations:** ADC, adenocarcinomas; NSCLC, Non Small Cell Lung Cancer; NOS, not otherwise specified; SCC, squamous cell carcinomas

**Table 2.** Multivariate Cox analysis of progression-free and overall survival. Summary of significant variables.

VARIABLES	TTP			OS		
	HR	95% IC	<i>p</i> <sup>b</sup>	HR	95% IC	<i>p</i> <sup>b</sup>
<b>Tumor size</b> <sup>a</sup>						
≥3.5 cm	2.296	1.303-4.048	0.004*	2.104	1.158-3.822	0.015*
< 3.5 cm	1.000			1.000		
<b>VEGF-B</b>						
Low	-	-	-	2.306	1.144-4.649	0.019*
High				1.000		
<b>VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D</b>						
↑VEGF-A/↓VEGF-B/↓ VEGF-D	4.321	2.255-8.280	<0.0001*	3.276	1.608-6.673	0.001*
Others	1.000			1.000		

<sup>a</sup> Tumor size was dichotomized according to the median; <sup>b</sup> *p* value was calculated according to log-rank test. **Abbreviations:** TTP, time to progression; OS, overall survival; ↑, high expression; ↓, low expression.

**Table 3.** Patient characteristics according to the levels of the combined variables VEGF-A, VEGF-B and VEGF-D.

Patient demographics	↑VEGF-A/↓VEGF-B/↓VEGF-D		Others		<i>p</i> <sup>a</sup>
	No.	%	No.	%	
<b>Total</b>	23	100	130	100	
<b>Age</b>					
Median	66.26		62.15		0.108
Range	47-85		26-82		
<b>Gender</b>					
Male	23	100	111	85.4	0.058
Female	0	0	19	14.6	
<b>Performance status</b>					
0	13	56.5	99	76.2	0.115
1	10	43.5	30	23.0	
2	0	0	1	0.8	
<b>Histology</b>					
SCC	13	56.5	61	46.9	0.625
ADC	8	34.8	50	38.5	
Others	2	8.7	19	14.6	
<b>Stage</b>					
I	9	39.2	68	52.3	0.493
II	7	30.4	33	25.4	
IIIA	7	30.4	29	22.	
<b>Smoking status</b>					
Current smoker	9	39.1	63	48.5	0.315
Former smoker	13	56.5	53	40.8	
Non-smoker	1	4.4	14	10.7	

<sup>a</sup>*p* was calculated by Mann Whitney test in the case of age and chi square test in the case of the others non-continuous variables.

**Abbreviations:** ADC, adenocarcinomas; SCC, squamous cell carcinomas; ↑, high expression; ↓, low expression

Figure 1

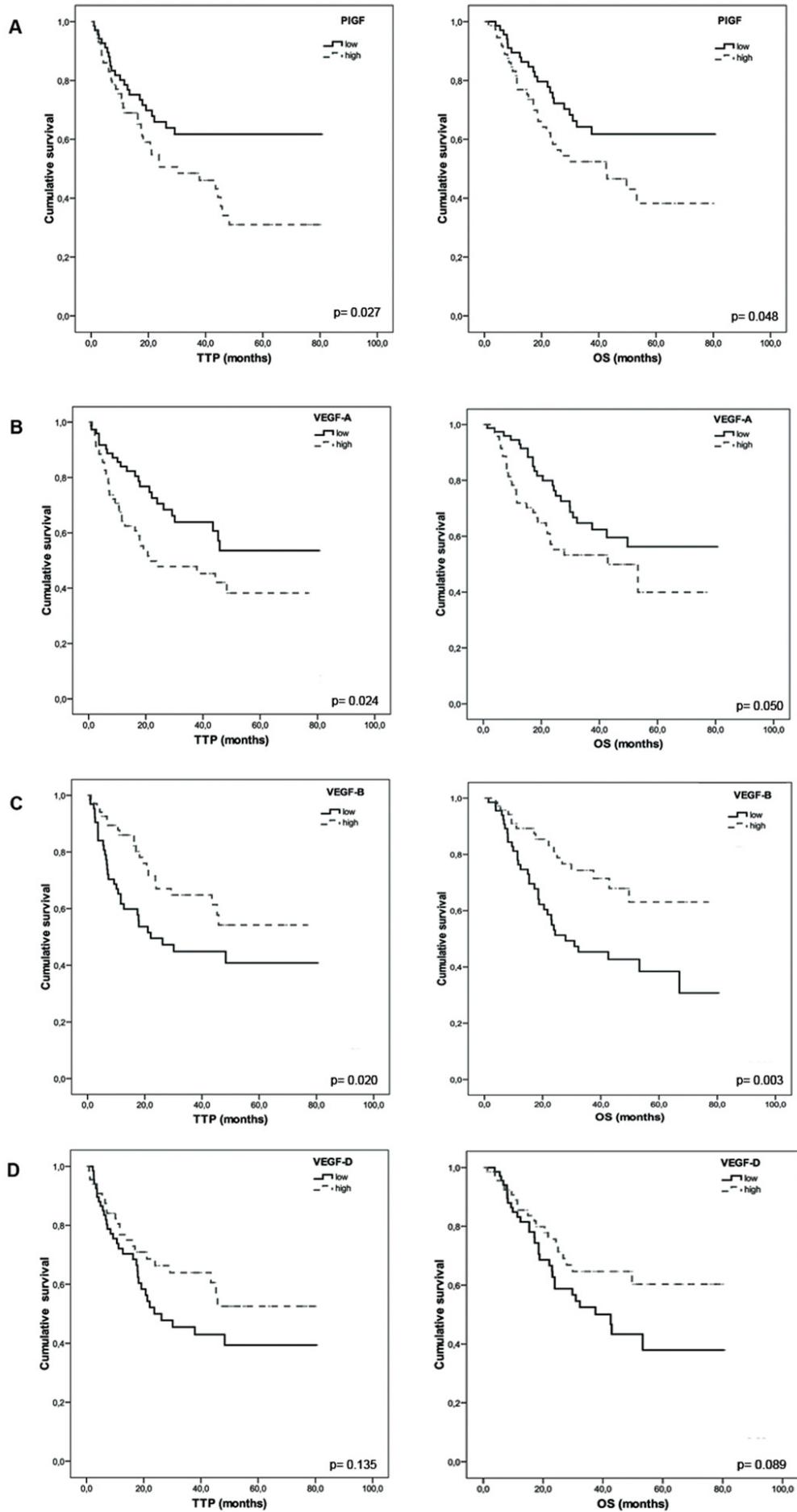
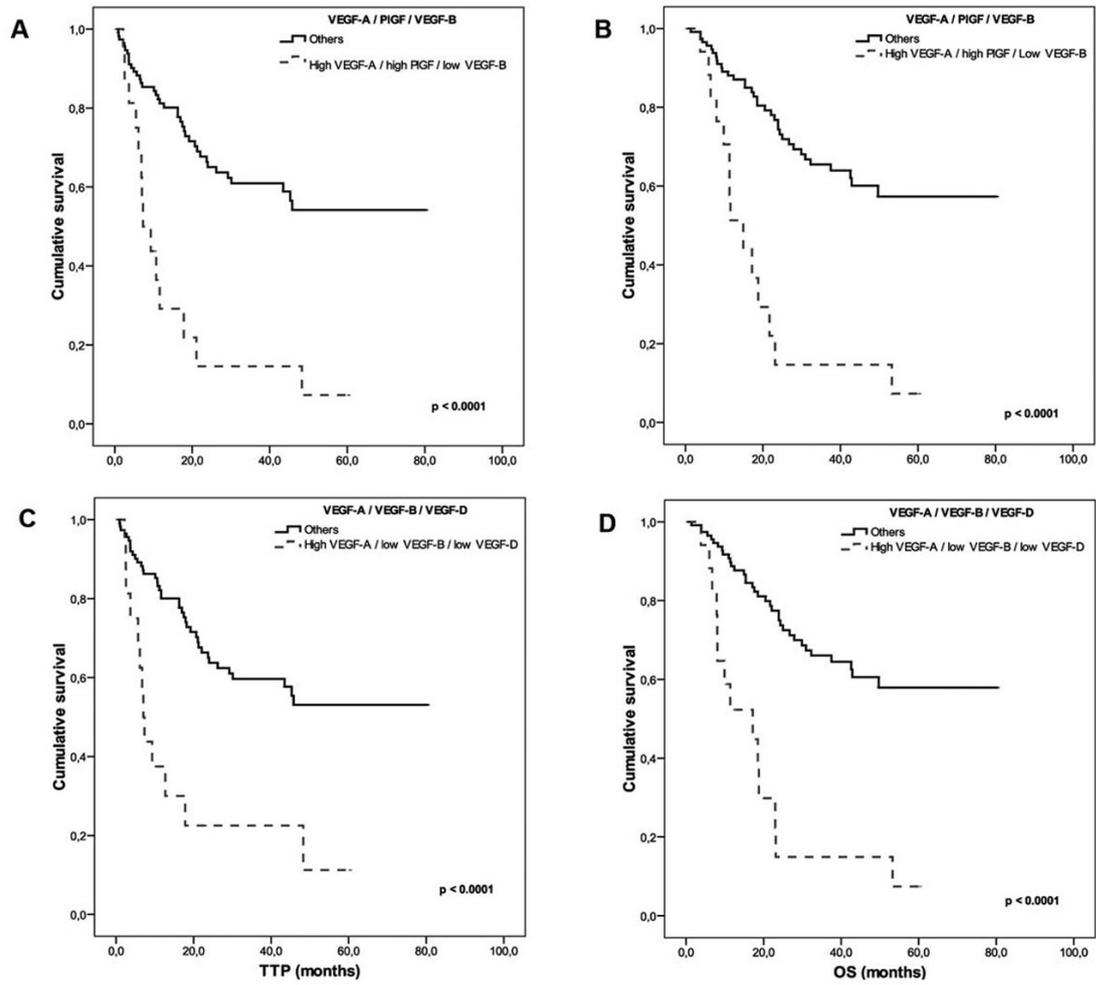


Figure 2



**Supplemental Digital Content 1. Gene Expression Assays.**

Gene symbol	Amplicon size (bp)	Assay Code
VEGF-A	60	Hs00900054_m1
VEGF-B	69	Hs00173634_m1
VEGF-C	66	Hs01099203_m1
VEGF-D	130	Hs00189521_m1
VEGFR-1	55	Hs00176573_m1
VEGFR-2	65	Hs00911708_m1
VEGFR-3	58	Hs01047678_m1
NRP-1	60	Hs00826125_m1
NRP-2	69	Hs01033069_m1
HIF-1A	76	Hs00153153_m1
PIGF	56	Hs00182176_m1

(A) TaqMan® Gene Expression Assays

**VEGF-A<sub>165b</sub> (Amplicon size: 94 bp)**

Primer forward: 5' TAA ATG TTC CTG CAA AAA CAC ACA CT 3'

Primer Reverse: 5' TCA GTC TTT CCT GGA GAG AGA TCT G 3'

Probe: 5'- 6-FAM-AGC TTG AGT TAA ACG AAC- MGB-3'

**GUS B (Amplicon size: 98 bp)**

Primer forward: 5' GAA AAT ATG TGG TTG GAG AGC TCA TT 3'

Primer Reverse: 5' CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A 3'

Probe: 5'- 6-FAM-CCA GCA CTC TCG TCG GTG ACT GTT CA-TAMRA-3'

(B) Custom TaqMan® Expression Assays

**Supplemental Digital Content 2.** Univariate analysis of clinico-pathological variables and angiogenic markers for TTP and OS in NSCLC patients.

VARIABLES	TTP		OS	
	Median survival (months)	<i>P</i> <sup>b</sup>	Median survival (months)	<i>P</i> <sup>b</sup>
<b>Age (y)</b>				
≤65	NR	0.448	NR	0.306
>65	37.9		53.3	
<b>Gender</b>				
Female	NR	0.382	NR	0.335
Male	45.3		53.3	
<b>Performance status</b>				
0	NR	0.033*	NR	0.021*
1/2	18.2		23.9	
<b>Histology</b>				
SCC	45.8	0.119	NR	0.122
ADC	45.3		67	
Others	11.2		18.5	
<b>Stage</b>				
I	48.3	0.195	NR	0.686
II	26.2		42.9	
IIIA	24.0		43.0	
<b>Tumor size<sup>a</sup></b>				
≤3.5 cm	NR	0.004*	NR	0.024*
>3.5 cm	20.7		37.5	
<b>Nodal status</b>				
N0	48.3	0.067	67.0	0.101
N1/N2	24.0		30.9	
<b>Differentiation</b>				
Well	29.2	0.602	NR	0.439
Moderate	48.3		53.3	
Poor	44.3		49.7	
<b>Smoking status</b>				
Non smoker	NR	0.953	NR	0.203
Former smoker	48.3		49.5	
Current smoker	44.3		NR	
<b>HIF1-A</b>				
Low	48.3	0.737	53.3	0.504
High	44.3		NR	
<b>VEGF-A</b>				
Low	NR	0.024*	NR	0.050*
High	21.1		42.9	
<b>VEGF-A<sub>165b</sub></b>				
Low	48.3	0.909	67.0	0.450
High	45.3		49.7	
<b>VEGF-B</b>				
Low	22.1	0.020*	27.9	0.003*
High	NR		NR	
<b>VEGF-C</b>				
Low	42.8	0.787	45.6	0.271
High	NR		67.0	
<b>VEGF-D</b>				
Low	23.7	0.135	42.6	0.089
High	NR		NR	
<b>PIGF</b>				
Low	NR	0.027*	NR	0.048*
High	30.1		42.6	
<b>VEGFR-1</b>				
Low	NR	0.470	53.3	0.763
High	44.3		NR	
<b>VEGFR-2</b>				
Low	40.3	0.613	42.6	0.164
High	45.3		67.0	
<b>VEGFR-3</b>				
Low	NR	0.697	67.0	0.682
High	43.5		53.3	
<b>NRP-1</b>				
Low	50.3	0.297	53.3	0.719
High	43.5		49.7	

## Supplemental Digital Content 2 continued

VARIABLES	TTP		OS	
	Median survival (months)	<i>p</i> <sup>b</sup>	Median survival (months)	<i>p</i> <sup>b</sup>
<b>NRP-2</b>				
Low	NR	0.303	30.9	0.061
High	43.5		67.0	
<b>VEGF-A/VEGF-B</b>				
↑VEGF-A/↓VEGF-B	11.6	<0.0001*	18.5	<0.0001*
Others	NR		NR	
<b>VEGF-A/VEGF-D</b>				
↑VEGF-A/↓VEGF-D	17.8	0.001*	23.1	0.003*
Others	NR		NR	
<b>VEGF-A/PIGF</b>				
↑VEGF-A/↑PIGF	18.2	0.001*	23.1	0.008*
Others	NR		NR	
<b>VEGF-B/PIGF</b>				
↓VEGF-B/↑PIGF	17.5	<0.0001*	18.5	<0.0001*
Others	NR		NR	
<b>VEGF-A/PIGF/VEGF-B</b>				
↑VEGF-A/↑PIGF/↓VEGF-B	7.3	<0.0001*	14.9	<0.0001*
Others	NR		NR	
<b>VEGF-A/VEGF-B/VEGF-D</b>				
↑VEGF-A/↓VEGF-B/↓VEGF-D	7.0	<0.0001*	17.2	<0.0001*
Others	NR		NR	
<b>VEGF-A/PIGF/VEGF-B/VEGF-D</b>				
↑VEGF-A/↑PIGF/↓VEGF-B/↓VEGF-D	7.3	0.001*	17.2	0.001*
Others	NR		NR	

<sup>a</sup> Tumor size was dichotomized according to the median; <sup>b</sup> *p* value was calculated according to log-rank test. **Abbreviations:** TTP, time to progression; OS, overall survival; ADC, adenocarcinomas; SCC, squamous cell carcinomas; NR, not reached; ↑, high expression; ↓, low expression

Supplemental digital content 3

