

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**ESTUDIO DE NEOANGIOGÉNESIS Y EXPRESIÓN  
GÉNICA DIFERENCIAL EN PACIENTES  
CON CÁNCER DE PULMÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Enrique Carrillo de Santa Pau**

Bajo la dirección de los doctores:  
Enrique Caso Peláez, María del Val Toledo Lobo y Fernando Carrillo Arias

**Madrid, 2007**

**ISBN: 978-84-669-3092-5**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**ESTUDIO DE NEOANGIOGÉNESIS Y EXPRESIÓN  
GÉNICA DIFERENCIAL EN PACIENTES CON  
CÁNCER DE PULMÓN**

**TESIS DOCTORAL**

ENRIQUE CARRILLO DE SANTA PAU

Madrid, 2007





Universidad  
Complutense  
Madrid

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**ESTUDIO DE NEOANGIOGÉNESIS Y EXPRESIÓN  
GÉNICA DIFERENCIAL EN PACIENTES CON  
CÁNCER DE PULMÓN**

Enrique Carrillo de Santa Pau, licenciado en Biología, ha realizado esta Tesis Doctoral en el Laboratorio de Oncología Molecular Aplicada, el Laboratorio de Neuroquímica y el Servicio de Neumología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, bajo la dirección del Dr. Enrique Caso Peláez, Director de la Fundación FICHUVI; la Dra. María del Val Toledo Lobo, Profesora del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá y el Dr. Fernando Carrillo Arias, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Neumología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.



Enrique Caso Peláez, Investigador y Director de la Fundación para la Investigación, Desarrollo e Innovación del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo,

HACE CONSTAR QUE,

D. ENRIQUE CARRILLO DE SANTA PAU, ha realizado la Tesis Doctoral titulada **ESTUDIO DE NEOANGIOGÉNESIS Y EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**, bajo mi dirección y, para que así conste, lo firmo en

Vigo a 31 de Enero del 2007.

Fdo. Enrique Caso Peláez.





María del Val Toledo Lobo, Profesora del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá,

HACE CONSTAR QUE,

D. ENRIQUE CARRILLO DE SANTA PAU, ha realizado la Tesis Doctoral titulada **ESTUDIO DE NEOANGIOGÉNESIS Y EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**, bajo mi dirección y, para que así conste, lo firmo en

Alcalá de Henares a 31 de Enero del 2007.

Fdo. María del Val Toledo Lobo.







Hospital Universitario  
Ramón y Cajal

Comunidad de Madrid

Ctra. de Colmenar Viejo  
Km 9,100 Cp 28034  
Madrid  
Tel: 91 336 80 00  
buzon@hro.es



Fernando Carrillo Arias, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Neumología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid,

HACE CONSTAR QUE,

D. ENRIQUE CARRILLO DE SANTA PAU, ha realizado la Tesis Doctoral titulada **ESTUDIO DE NEOANGIOGÉNESIS Y EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**, bajo mi dirección y, para que así conste, lo firmo en

Madrid a 31 de Enero del 2007.

Fdo. Fernando Carrillo Arias.



A mis padres, hermano y familia. Por estar siempre ahí en los buenos y malos momentos, sin llegar a comprender muy bien en lo que andaba metido, animando con todo su cariño para que no abandonara en los momentos en los que una tesis deja de tener sentido.

A Maribel. Por escoger a este biólogo en su vida, por su paciencia y comprensión desde que nos conocimos y, especialmente, durante la escritura de este trabajo, porque parte del tiempo invertido era tuyo.

A mis directores. A los que un joven ilusionado pero sin curriculum ni notas, les pareció una apuesta con futuro. Por su apoyo, confianza y enseñanzas en mi formación como investigador, sin los cuales nunca hubiera llegado tan lejos en el mundo de la ciencia.

A todos vosotros (que sois muchos y no voy a nombrar, porque injusto sería olvidarme de alguno), que tan bien os habéis portado conmigo, y habéis contribuido con vuestro esfuerzo y trabajo a que esta tesis se haya hecho realidad.

**GRACIAS**



## RESUMEN

**A** ctualmente, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en el mundo, con una supervivencia menor del 15% al cabo de cinco años de detectarse e iniciarse el tratamiento. Esta baja supervivencia se debe a procesos metastásicos tempranos, que ocurren en los estadios precoces del desarrollo tumoral, para los que no disponemos de medios eficaces para su detección. Hoy conocemos que los fenómenos de progresión tumoral, invasión y metástasis que conducen a la malignización neoplásica van a depender del proceso de neoangiogénesis. En este trabajo se aplican, en muestras clínicas, técnicas de biología celular y molecular para el estudio de la neoangiogénesis y la búsqueda de marcadores diagnósticos. Para ello se realiza un estudio con inmunohistoquímica en tejido y ELISA en sangre, de los factores y receptores de la familia del VEGF, el factor angiogénico más potente conocido hasta la fecha. Finalmente, se aplican técnicas de análisis múltiple de expresión génica diferencial en muestras clínicas de pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón, con objeto de identificar genes candidatos a marcadores diagnósticos.

## SUMMARY

**L** ung cancer is the leading cause of cancer-related death throughout the world. In general diagnosed patients with lung cancer have a 5-year survival of 15%. Many patients who initially appear to have early-stage disease will ultimately experience a distant relapse, indicating that even early-stage NSCLC may be a systemic disease at diagnosis and that we don't actually have effective tools to detect micro-metastatic disseminations. Invasion, metastasis and tumor progression depend on the acquisition of a neoangiogenic phenotype. Pathology samples of lung cancer were analyzed applying cellular and molecular biology techniques for neoangiogenic study and search biomarkers for early lung cancer detection. For this purpose, immunohistochemical techniques for human vascular endothelial growth factors (VEGF) and receptors (VEGFR) and blood serum ELISA for VEGF, the most powerful angiogenesis factor known to date, were performed. Finally, lung cancer samples were examined by microarrays to display their differential expression profiles, in order to identify candidate genes involved in adenocarcinoma early detection.



# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| Agradecimientos .....  | 11        |
| Resumen .....  | 13        |
| Índice .....   | 15        |
| Abreviaturas.....  | 21        |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>25</b> |
| 1.1 Factores de Riesgo .....   | 25        |
| 1.2 Clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón.....  | 27        |
| 1.3 Diagnóstico, pronóstico y tratamiento .....  | 28        |
| 1.4 Biología molecular del cáncer de pulmón.....   | 34        |
| 1.4.1. Predisposición genética.....  | 34        |
| 1.4.2. Detección precoz e implicaciones diagnósticas .....   | 35        |
| 1.4.3. Marcadores pronóstico .....   | 36        |
| 1.4.4. Marcadores Moleculares Predictivos de la Respuesta<br>al Tratamiento y como Dianas Terapéuticas ..... | 37        |
| 1.5 Angiogénesis y linfangiogénesis tumoral .....  | 39        |
| 1.6 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....   | 43        |
| 1.6.1. Estructura y función .....  | 44        |
| 1.6.2. El gen VEGF y sus isoformas .....   | 45        |
| 1.6.3. Regulación de la expresión de VEGF .....  | 47        |
| 1.6.4. Proteínas relacionadas con VEGF .....   | 48        |
| 1.6.4.1. Factor de crecimiento placentario (PLGF).....   | 48        |
| 1.6.4.2. VEGF-B .....  | 49        |
| 1.6.4.3. VEGF-C .....  | 49        |
| 1.6.4.4. VEGF-D .....  | 50        |
| 1.6.4.5. VEGF-E.....   | 51        |
| 1.6.4.6. VEGF-F.....   | 51        |
| 1.6.5. Receptores de VEGF .....  | 52        |
| 1.6.5.1. VEGFR1/Flt-1 .....  | 52        |
| 1.6.5.2. VEGFR2/Flk-1 .....  | 53        |
| 1.6.5.3. VEGFR3/Flt-4.....   | 54        |



|  |           |
|--|-----------|
| 1.6.5.4. Neuropilinas (NRPs).....  | 55        |
| 1.6.6. Mecanismos de transducción de señales.....  | 55        |
| 1.6.6.1. Vía VEGFR1/Flt-1.....   | 55        |
| 1.6.6.2. Vía VEGFR2/Flk-1.....   | 56        |
| 1.6.6.3. Vía VEGFR3/Flt-4.....   | 58        |
| 1.6.7. Implicaciones clínicas del análisis de los factores<br>de la familia del VEGF y sus receptores..... | 58        |
| 1.6.7.1. Implicaciones pronósticas.....  | 58        |
| 1.6.7.2. Implicaciones en la predicción de la respuesta<br>al tratamiento.....                             | 61        |
| 1.6.7.3. Implicaciones en el tratamiento del cáncer.....   | 61        |
| 1.7. Los estudios de <i>microarrays</i> .....  | 62        |
| 1.7.1. Los estudios de <i>microarrays</i> en el cáncer de pulmón.....                                      | 64        |
| 1.8. La investigación en el ámbito hospitalario.....   | 67        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  | <b>73</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>77</b> |
| 3.1. Materiales.....   | 77        |
| 3.1.1. Productos.....  | 77        |
| 3.1.2. Población y muestras.....   | 79        |
| 3.1.2.1. Población a estudiar.....   | 79        |
| 3.1.2.2. Muestras a estudiar.....  | 80        |
| 3.1.2.2.1. Muestras de tejido pulmonar.....  | 80        |
| 3.1.2.2.2. Sangre y suero.....   | 81        |
| 3.2. Métodos.....  | 82        |
| 3.2.1. Técnicas inmunohistoquímicas.....   | 82        |
| 3.2.1.1. Soluciones y reactivos empleados.....   | 82        |
| 3.2.1.2. Procesamiento de las muestras.....  | 83        |
| 3.2.1.3. Inclusión de muestras en parafina.....  | 83        |
| 3.2.1.4. Tinción con hematoxilina-eosina.....  | 84        |
| 3.2.1.5. Inmunohistoquímica para la familia<br>del factor VEGF y sus receptores.....                       | 85        |
| 3.2.1.6. Evaluación de la expresión proteica.....  | 86        |
| 3.2.1.7. Análisis estadístico.....   | 87        |

|  |     |
|--|-----|
| 3.2.2. Técnicas Inmunoenzimáticas (ELISA) .....                                  | 88  |
| 3.2.2.1. Soluciones y reactivos empleados.....                                   | 88  |
| 3.2.2.2. Procesamiento de las muestras.....                                      | 89  |
| 3.2.2.3. Procedimiento inmunoenzimático para<br>la cuantificación de VEGF-A..... | 89  |
| 3.2.2.4. Cálculo de los resultados.....  | 90  |
| 3.2.2.5. Análisis estadístico.....   | 90  |
| 3.2.3. Técnicas <i>Microarrays</i> .....   | 91  |
| 3.2.3.1. Soluciones y reactivos empleados.....                                   | 91  |
| 3.2.3.2. Tratamiento previo del material para<br>la extracción de RNA.....       | 93  |
| 3.2.3.3. RNA .....   | 93  |
| 3.2.3.3.1. Extracción.....   | 93  |
| 3.2.3.3.2. Purificación.....   | 94  |
| 3.2.3.3.3. Evaluación .....  | 94  |
| 3.2.3.4. cDNA .....  | 95  |
| 3.2.3.4.1. Síntesis de cDNA monocatenario.....                                   | 95  |
| 3.2.3.4.2. Síntesis de cDNA bicatenario.....                                     | 95  |
| 3.2.3.4.3. Purificación.....   | 96  |
| 3.2.3.5. cRNA .....  | 96  |
| 3.2.3.5.1. Transcripción <i>in vitro</i> de cRNA biotinilado .....               | 96  |
| 3.2.3.5.2. Purificación.....   | 97  |
| 3.2.3.5.3. Evaluación cRNA .....   | 97  |
| 3.2.3.5.4. Fragmentación del cRNA .....  | 98  |
| 3.2.3.5.5. Evaluación del cRNA fragmentado .....                                 | 99  |
| 3.2.3.6. <i>Microarrays</i> de oligonucleótidos .....                            | 99  |
| 3.2.3.6.1. Hibridación .....   | 99  |
| 3.2.3.6.2. Lavados y tinción.....  | 100 |
| 3.2.4. Análisis bioinformático.....  | 101 |
| 3.2.4.1. Análisis de imagen y normalización .....                                | 101 |
| 3.2.4.2. Algoritmos estadísticos de Affymetrix .....                             | 102 |
| 3.2.4.3. Análisis descriptivo según el algoritmo de detección.....               | 102 |
| 3.2.4.4. Análisis estadístico según el valor señal .....                         | 103 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.4.5. Algoritmos de agrupamiento .....                                   | 103 |
| 3.2.4.5.1. Algoritmo de agrupamiento jerarquizado .....                     | 104 |
| 3.2.4.5.2. Algoritmo de Análisis por Componentes<br>Principales (ACP) ..... | 104 |
| 3.2.4.6. Bases de datos.....  | 104 |

## **4. RESULTADOS** **109**

---

|   |     |
|---|-----|
| 4.1 Estudio Inmunohistoquímico.....   | 109 |
| 4.1.1 Tejido sano.....  | 109 |
| 4.1.1.1. Población. Características clínicas y<br>anatomopatológicas .....                        | 109 |
| 4.1.1.2. Estudio de la expresión de los factores<br>de la familia del VEGF y sus receptores ..... | 109 |
| 4.1.2. Tejido tumoral .....   | 110 |
| 4.1.2.1. Población. Características clínicas y<br>anatomopatológicas .....                        | 110 |
| 4.1.2.2. Estudio de la expresión de los factores<br>de la familia del VEGF y sus receptores ..... | 113 |
| 4.1.2.2.1. Expresión en célula tumoral.....   | 113 |
| 4.1.2.2.1.1. Expresión en célula tumoral<br>según la edad y el tamaño del tumor .....             | 116 |
| 4.1.2.2.1.2. Expresión en célula tumoral<br>según la localización del tumor .....                 | 118 |
| 4.1.2.2.1.3. Expresión en célula tumoral<br>según el tipo histológico.....                        | 120 |
| 4.1.2.2.1.4. Expresión en célula tumoral<br>según la estadificación.....                          | 124 |
| 4.1.2.2.2. Expresión en célula endotelial.....  | 131 |
| 4.1.2.2.2.1. Expresión en célula tumoral<br>según la edad y el tamaño del tumor .....             | 131 |
| 4.1.2.2.2.2. Expresión en célula tumoral<br>según la localización del tumor .....                 | 134 |
| 4.1.2.2.2.3. Expresión en célula tumoral<br>según el tipo histológico .....                       | 135 |
| 4.1.2.2.2.4. Expresión en célula tumoral<br>según la estadificación.....                          | 137 |
| 4.1.2.2.3. Estudio de la expresión de VEGFR3<br>en el núcleo de las células tumorales.....        | 138 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.1.2.2.4. Análisis de la supervivencia .....  | 140 |
| 4.1.2.2.4.1. Análisis de la supervivencia<br>según la edad y el tamaño del tumor.....  | 140 |
| 4.1.2.2.4.2. Análisis de la supervivencia<br>según el tipo histológico .....   | 143 |
| 4.1.2.2.4.3. Análisis de la supervivencia<br>según la estadificación .....   | 144 |
| 4.1.2.2.4.4. Análisis de la supervivencia<br>según la expresión de los factores<br>y receptores de la familia del VEGF<br>en célula tumoral.....     | 145 |
| 4.1.2.2.4.5. Análisis de la supervivencia<br>según la expresión de los factores<br>y receptores de la familia del VEGF<br>en célula endotelial ..... | 147 |
| 4.1.2.2.4.6. Análisis de la supervivencia<br>según la expresión de VEGFR3<br>en el núcleo de las células tumorales .....                             | 148 |
| 4.1.3. Tejido peritumoral.....   | 149 |
| 4.1.3.1. Población. Características clínicas y<br>anatomopatológicas.....  | 149 |
| 4.1.3.2. Estudio de la expresión de los factores<br>de la familia del VEGF y sus receptores.....   | 150 |
| 4.2 Estudio Inmunoenzimático .....   | 156 |
| 4.2.1. Control de la recta patrón.....   | 156 |
| 4.2.2. Población. Características clínicas y anatomopatológicas .....  | 156 |
| 4.2.3. Estudio de la cuantificación de VEGF-A en suero .....   | 159 |
| 4.2.4. Análisis de la supervivencia.....   | 160 |
| 4.2.4.1. Análisis de la supervivencia<br>según la cuantificación de VEGF-A en suero.....   | 161 |
| 4.2.4.2. Análisis de la supervivencia<br>según la edad y el tamaño del tumor.....  | 162 |
| 4.2.4.3. Análisis de la supervivencia<br>según el tipo histológico .....   | 164 |
| 4.2.4.4. Análisis de la supervivencia según la estadificación .....  | 166 |
| 4.3 Estudio mediante <i>microarrays</i> de oligonucleótidos .....  | 168 |
| 4.3.1. Controles de calida de las muestras de RNA .....  | 168 |
| 4.3.2. Análisis de los controles tras la hibridación<br>y el escaneado de los arrays .....   | 170 |

|  |               |
|--|---------------|
| 4.3.3. Perfiles de expresión génica diferencial<br>en los tejidos sanos, peritumorales y tumorales.....              | 172           |
| 4.3.4. Genes candidatos a marcadores tumorales .....   | 173           |
| 4.3.5. Genes relacionados con los procesos<br>de angiogénesis y linfangiogénesis tumoral.....                        | 183           |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>  | <b>189</b>    |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>   | <b>221</b>    |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>227</b>    |
| Recursos internet .....  | 280           |
| <b>8. ANEXOS</b>   | <b>CD-ROM</b> |
| Anexo I. Muestras analizadas, estirpe histológica y estadio para<br>cada uno de los casos estudiados.                |               |
| Anexo II. Tablas de supervivencia estudio inmunohistoquímico.  |               |
| Anexo III. Tablas de supervivencia estudio inmunoenzimático.   |               |
| Anexo IV. Genes diferencialmente expresados entre los distintos<br>tipos de tejido, según el algoritmo de detección. |               |

## ABREVIATURAS

|                    |   |
|--------------------|---|
| ACP                | Análisis por Componentes Principales                          |
| ANOVA              | Análisis de la Varianza                                       |
| COL                | Colágeno  |
| DNA                | Ácido desoxirribonucleico                                     |
| cDNA               | Ácido desoxirribonucleico complementario                      |
| dscDNA             | Ácido desoxirribonucleico bicatenario                         |
| sscDNA             | Ácido desoxirribonucleico monocatenario                       |
| ELISA              | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>                      |
| FDA                | <i>US Food and Drug Administration</i>                        |
| FWER               | <i>Type I Family Wise Error Rate</i>                          |
| GAPDH              | Gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa                        |
| ddH <sub>2</sub> O | Agua doblemente destilada                                     |
| HIF                | Factor inducible por hipoxia                                  |
| IASLC              | Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón |
| KDR                | Receptor con dominios kinasa                                  |
| MMP                | Metaloproteasa de matriz                                      |
| NCBI               | <i>National Center for Biotechnology Information</i>          |
| NRP                | Neuropilina   |
| OMS                | Organización Mundial de la Salud                              |
| PBS                | Tampón fosfato salino   |
| PCR                | Reacción en cadena de la polimerasa                           |
| PLGF               | Factor de crecimiento placentario                             |
| RNA                | Ácido ribonucleico  |
| mRNA               | Ácido ribonucleico mensajero                                  |
| SLR                | <i>Signal Log Ratio</i>                                       |
| TACAR              | Tomografía axial computerizada de alta resolución             |
| TAE                | Tampón tris acetato   |
| TBS                | Tampón tris salino  |
| TKR                | Receptor tirosina-kinasa                                      |
| VEGF               | Factor de crecimiento del endotelio vascular                  |
| VEGFR              | Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular     |
| VPF                | Factor de permeabilidad vascular                              |



## **1. INTRODUCCIÓN**





**A**nivel global el cáncer es la tercera causa de muerte en el mundo y la segunda en los países industrializados tras las enfermedades cardiovasculares. A lo largo del año 2005 se estima que fallecieron 58 millones de personas en todo el mundo, y de estos fallecimientos, 7.6 millones (13%) fueron debidos al cáncer<sup>1</sup>. Los datos disponibles en Europa indican que al año se diagnostican alrededor de 2.886.800 nuevos casos de cáncer y que más de un millón y medio de personas fallecen como consecuencia de esta enfermedad<sup>2</sup>. Las previsiones de la Organización Mundial de la Salud establecen que el número de personas fallecidas debido al cáncer aumentarán hasta los 84 millones de personas a lo largo de los próximos diez años en todo el mundo y, que en los próximos veinticinco años disminuirán las expectativas de vida de las personas afectadas por esta enfermedad<sup>3</sup>.

Actualmente, el cáncer de pulmón es la novena causa más importante de fallecimiento y se estima que en el año 2030 habrá subido hasta el sexto puesto<sup>3</sup>. El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo produciendo 1.3 millones de fallecimientos al año, siendo en hombres la primera causa de muerte por cáncer y la segunda en mujeres tras el cáncer de mama<sup>1</sup>. Los datos disponibles para la incidencia y la mortalidad por cáncer en Europa muestran que, en el año 2004, el cáncer de pulmón fue el tumor más diagnosticado con 381.500 nuevos casos (el 13,2% del total) y la principal causa de fallecimiento por cáncer con 341.800 fallecidos. El análisis por sexo de los pacientes que fueron diagnosticados mostró que en hombres, el cáncer de pulmón fué el tumor más diagnosticado con 298.600 nuevos casos y el cuarto en mujeres con 82.900 nuevos casos. La mortalidad por cáncer de pulmón en hombres fue de 268.300 fallecidos y 73.500 fallecidos en mujeres, lo que supone, en Europa, la principal causa de mortalidad por cáncer en hombres y la tercera en mujeres<sup>2</sup>.

## 1.1 Factores de riesgo

El consumo activo de tabaco es la principal causa desencadenante de cáncer de pulmón, y de hecho se considera que los productos tóxicos que contiene el humo del

tabaco son los responsables en los países desarrollados de aproximadamente un 90% de estos tumores en hombres, y un 80% de los que acontecen en mujeres<sup>4</sup>.

Actualmente se conoce el papel fundamental que juega el tabaquismo activo en el desarrollo del cáncer de pulmón<sup>5-9</sup>. Existe una clara relación dosis-respuesta, entre la intensidad del hábito tabáquico y el riesgo de padecer cáncer de pulmón, incluso los fumadores en escasa cuantía incrementan el riesgo respecto a los no fumadores<sup>10-13</sup>. Por otra parte, el abandono del hábito se ha asociado con una disminución progresiva del riesgo de padecer cáncer de pulmón. El riesgo relativo de padecer cáncer de pulmón comienza a disminuir a los cinco años de haber dejado de fumar y continúa bajando a lo largo del tiempo, pero sin llegar a igualarse totalmente al de los no fumadores<sup>13</sup>.

No obstante, de todas las personas que consumen tabaco, únicamente entre un 10%-20% acaban desarrollando un cáncer de pulmón<sup>4</sup>. Esto sugiere la existencia de una predisposición genética en estos fumadores que desarrollan cáncer, ya que entre familiares directos de enfermos de cáncer de pulmón se ha encontrado un riesgo superior de padecer esta enfermedad<sup>9,14-16</sup>.

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%<sup>8,13,17,18</sup>.

Otros factores importantes que se han visto implicados en el desarrollo del cáncer de pulmón son la exposición a asbesto, silicatos fibrosos de estructura cristalina también denominados amianto, que se supone el carcinógeno ocupacional más relevante en España, y el radón procedente de la desintegración del radio, que está presente en la mayoría de los suelos, en materiales de construcción y de manera significativa en minas y túneles. 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<sup>4,13</sup>.

## 1.2 Clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón

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. La última clasificación histológica del cáncer de pulmón, propiciada por la OMS y por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) en 1999, recoge y actualiza la información de las clasificaciones previas que se han sucedido desde 1924<sup>19</sup>.

La clasificación histológica del cáncer de pulmón se divide principalmente en dos grandes grupos: 1) los tumores de células pequeñas, compuesto por células pequeñas con escaso citoplasma, límites celulares mal definidos, cromatina finamente granular y nucléolos inconspicuos o invisibles. Las células son redondeadas, ovales o fusiformes con moldeamiento nuclear y muestran gránulos de neurosecreción en su citoplasma. Además, presentan abundante necrosis y una alta tasa mitótica; 2) los tumores no microcíticos, compuestos por células de un tamaño mayor, con abundancia de citoplasma, presencia de nucléolos y no muestran gránulos de neurosecreción. Esta clasificación se debe principalmente a las diferencias observadas en su comportamiento clínico, tendencia a la diseminación metastática y respuesta al tratamiento<sup>19</sup>.

Los tumores de células pequeñas representan alrededor del 20% de todos los tumores de pulmón diagnosticados. Suelen tener una localización peribronquial y con un alto porcentaje de metástasis en el momento del diagnóstico. Su diagnóstico se establece mediante biopsia bronquial o citología. Estos tumores presentan una evolución clínica muy agresiva, síndromes paraneoplásicos y suelen ser sensibles a quimioterapia<sup>19</sup>.

Los tumores no microcíticos se dividen en tres grandes grupos: el carcinoma escamoso o epidermoide, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes. El carcinoma epidermoide representa aproximadamente el 30% de todos los tumores de pulmón diagnosticados. Dos terceras partes suelen tener una localización central, mientras la otra tercera parte suele tener una localización periférica. El adenocarcinoma

de pulmón también representa el 30% de todos los cánceres de pulmón diagnosticados, siendo heterogéneo desde el punto de vista histológico y presentando normalmente dos o más subtipos histológicos. Finalmente, el carcinoma de células grandes representa el 9% de todos los tumores de pulmón. Estos tumores suelen tener una localización periférica, aunque también pueden presentar una localización central<sup>19</sup>.

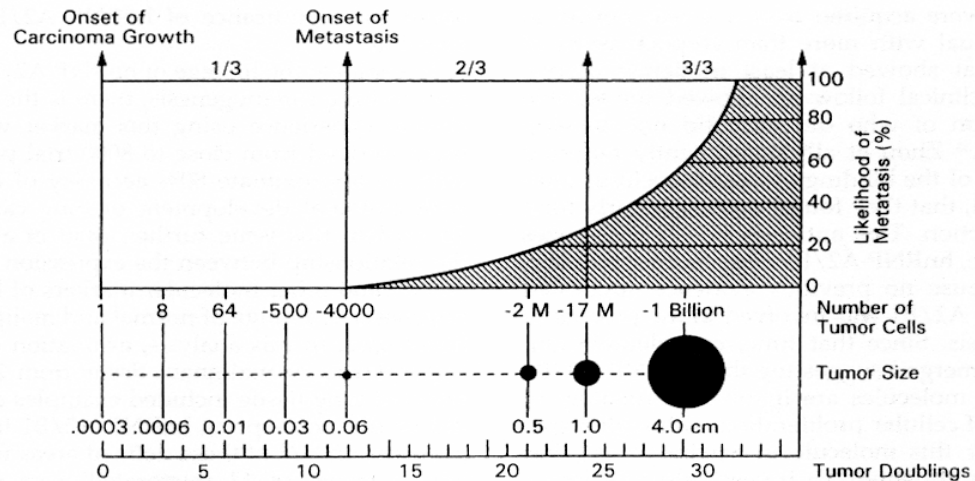
La clasificación histológica del cáncer de pulmón propiciada por la OMS y por la IASLC en 1999, además, incluye un apartado para las lesiones preinvasivas, debido al gran interés suscitado en los últimos años en la detección precoz del cáncer de pulmón. Esta clasificación cita cuatro tipos de lesiones preinvasivas: la displasia escamosa, el carcinoma *in situ*, la hiperplasia adenomatosa y las hiperplasias idiopáticas de células neuroendocrinas, todas ellas con capacidad para desarrollar tumores<sup>19</sup>.

### **1.3 Diagnóstico, pronóstico y tratamiento**

El diagnóstico del cáncer de pulmón se ve dificultado por la ausencia de síntomas en pacientes con tumores en un estado precoz, diagnosticándose en la mayoría de los casos en fases avanzadas. La hemoptisis raramente se presenta en pacientes con tumores en un estadio temprano, normalmente los síntomas comienzan a aparecer en fases avanzadas de la enfermedad con la infiltración de tejidos adyacentes o su diseminación a distancia.

La experiencia general ha demostrado que aquellos pacientes sintomáticos diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad presentan una pobre supervivencia, menor del 15%, al cabo de cinco años de detectarse e iniciarse el tratamiento<sup>13</sup>. Sin embargo los tumores detectados en los estadios asintomáticos hacen que la supervivencia de estos pacientes sobrepase el 70% a los cinco años<sup>20,21</sup>.

La baja supervivencia del cáncer de pulmón se debe a procesos metastásicos tempranos que ocurren en los estadios precoces del desarrollo tumoral, cuando el tumor apenas llega a alcanzar un milímetro de tamaño (figura 1), para cuya detección no se dispone de medios eficaces<sup>22</sup>. La radiografía torácica y los estudios citológicos en esputo se han revelado como métodos ineficaces en la detección precoz del cáncer de



**Figura 1.-** Teoría progresiva de la carcinogénesis, donde la frecuencia de diseminación metastática se relaciona con el tamaño del tumor (Reproducido de Mulshine y cols.<sup>22</sup>).

pulmón y, por lo tanto, no inciden en la mejoría de los índices de supervivencia de los pacientes<sup>23</sup>. Por otro lado, la tomografía axial computerizada de alta resolución (TACAR), se ha mostrado en los últimos años mucho más sensible que la radiografía torácica, detectando un mayor número de tumores, al poder llegar a detectar lesiones menores de un centímetro. No obstante, entre el 90%-95% de los nódulos detectados por la TACAR no son tumorales, resultando mayor la probabilidad de ser maligno cuanto mayor es el tamaño del nódulo detectado. Esto hace que sea necesario confirmar el diagnóstico mediante procedimientos invasivos como la broncoscopia, la punción o la toracotomía entre otros. Además, no se conoce el beneficio del paciente en relación a la disminución de la mortalidad mediante el empleo de esta técnica<sup>24-26</sup>.

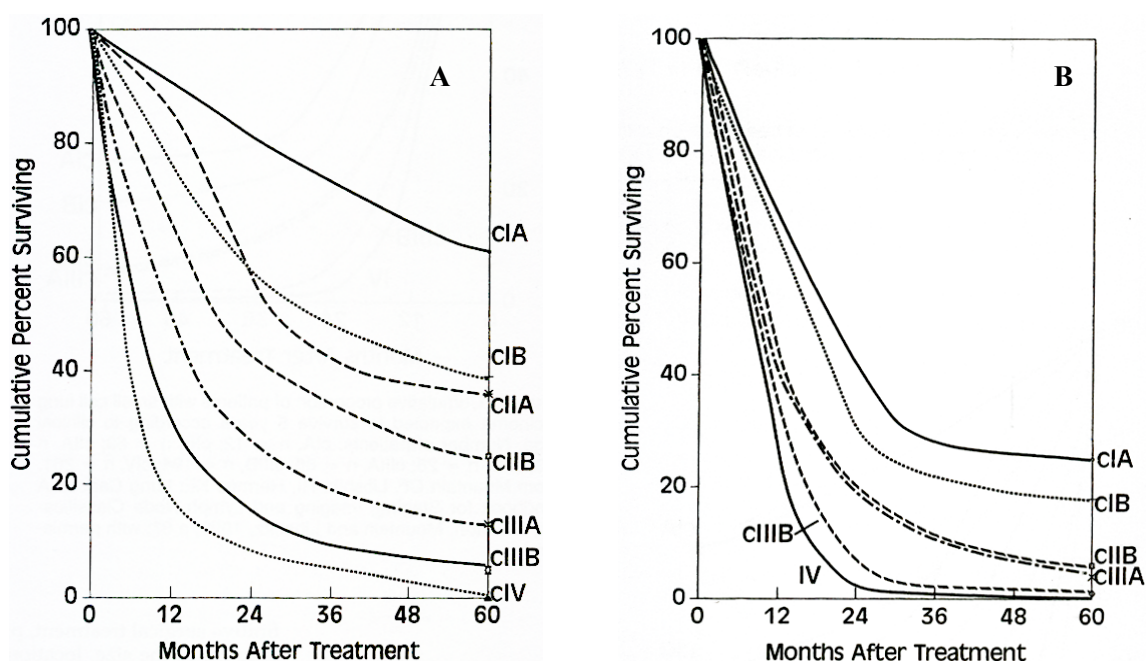
La actual estadificación del cáncer de pulmón se basa exclusivamente en la extensión anatómica de la enfermedad. El sistema de clasificación anatómica utiliza tres parámetros (TNM) para describir la extensión tumoral: la extensión del tumor primario (T), la ausencia o presencia de metástasis ganglionares regionales (N) y la ausencia o presencia de metástasis por vía hematógena a distancia (M). Estos parámetros tienen diversos subíndices que indican la magnitud de la afectación<sup>20,27</sup>.

Esta clasificación se ha venido utilizando desde finales de la década de los años cuarenta, y se ha ido completando y refinando hasta su más reciente edición en 1997, difundida por la *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) y por la *American*

Joint Committee on Cancer (AJCC) y, aceptada explícitamente por la American Thoracic Society (ATS), la European Respiratory Society (ERS) y la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)<sup>20,27</sup>.

El parámetro T se define tanto por el tamaño tumoral, como por su localización endobronquial y por la estructura afectada. Tiene siete sufijos, 0, x, is y del 1 al 4, que indican de forma progresiva el mayor grado de extensión del tumor primario. El parámetro N define la ausencia o presencia de afectación ganglionar, y esta última tiene tres grados de extensión. Por último, el parámetro M indica la presencia o ausencia de metástasis distantes<sup>20,27</sup> (tabla 1).

Los grupos de TNM de pronóstico parecido se agrupan en seis estadios, tres de los cuales se subdividen en dos cada uno (tabla 2). El pronóstico de la enfermedad esta directamente relacionado con la extensión tumoral, de tal forma que a mayor estadio tumoral peor pronóstico<sup>27</sup> (figura 2).



**Figura 2.-** Curvas de supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón al cabo de cinco años, según el estadio clínico. **A;** Pacientes con tumores no microcítico. **B;** Pacientes con tumores de células pequeñas (Reproducido de Mountain C.F.<sup>20</sup>).

| <b>Tumor primario</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 3 cm o menos en su dimensión mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más próxima 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 3 cm en su dimensión mayor; afectación del bronquio principal, 2 cm o más distal a la carina; invasión de la pleura visceral; asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar, pero no afecta al pulmón entero.                             |
| <b>T3</b>                                | Tumor de cualquier tamaño que invade directamente cualquiera de lo siguiente: pared torácica (incluyendo tumores del surco posterior), diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal menos de 2 cm distal a la carina, pero sin afectación de la carina; o atelectasia o neumonitis obstructiva asociada del pulmón entero. |
| <b>T4</b>                                | Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de lo siguiente: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral, carina; nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en el mismo lóbulo; tumor con derrame pleural maligno.   |
| <b>N. Ganglios linfáticos regionales</b> |   |
| <b>Nx</b>                                | Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.   |
| <b>N0</b>                                | No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales.  |
| <b>N1</b>                                | Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hilares ipsilaterales y ganglios intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa.   |
| <b>N2</b>                                | Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales o subcarínicos.   |
| <b>N3</b>                                | Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hilares contralaterales, escalenos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales.  |
| <b>M. Metástasis distantes</b>           |   |
| <b>Mx</b>                                | Las metástasis distantes no pueden ser evaluadas.   |
| <b>M0</b>                                | No hay metástasis distantes.  |
| <b>M1</b>                                | Metástasis distantes, incluye nódulo(s) separado(s) en un lóbulo diferente, ipsilateral o contralateral.  |

**Tabla 1.-** Clasificación TNM del cáncer de pulmón.



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

**Tabla 2.-** Agrupación por estadios.

Una de las características de la clasificación TNM es que no requiere un número mínimo de pruebas para realizarla y está basada en todas las pruebas diagnósticas y evaluativas efectuadas antes de iniciar el tratamiento, mediante métodos clínicos de imagen como la radiografía torácica y la TACAR, así como en procedimientos invasivos endoscópicos y quirúrgicos como la broncoscopia, la mediastinoscopia, la toracoscopia y la toracotomía diagnósticas<sup>20</sup>.

Esta estadificación tumoral puede realizarse en diferentes momentos del proceso diagnóstico-terapéutico: antes del 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 (TNMc) permite adjudicar el mejor tratamiento al paciente, mientras que la estadificación patológica (TNMp) es más precisa que la estadificación clínica y se ajusta más a la realidad de la extensión tumoral. Sirve para emitir un pronóstico y para decidir la idoneidad del tratamiento de consolidación. La estadificación después o durante el tratamiento de inducción

(estadificación TNMy) 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<sup>27</sup>.

Los principios del tratamiento del cáncer de pulmón han variado poco en los últimos cincuenta años, basándose en la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia o en una combinación de éstos. Durante la primera mitad del siglo XX no existió ningún tratamiento efectivo para el cáncer de pulmón. Sin embargo, en los últimos cincuenta años, la cirugía ha sido la principal opción para ofrecer una oportunidad de curación a estos pacientes<sup>24</sup>.

La elección del tratamiento en el cáncer de pulmón va a depender en un primer momento de la clasificación anatomopatológica del tumor y del estadio de la enfermedad. Los tumores no microcíticos en estadios I y II son considerados tradicionalmente como “enfermedad localizada” y por lo tanto candidatos a resección quirúrgica. La tasa de curación de estos tumores se sitúa entre el 30%-70%, aunque sólo un 24% de los pacientes diagnosticados con tumores del tipo no microcíticos presentan estadios I y II. Sin embargo, la mayor parte presentan enfermedad localmente avanzada (estadios IIIa y IIIb) o diseminada (IV), considerados como “irresecables” en el momento del diagnóstico, siendo aproximadamente el 44% y el 35% respectivamente de los tumores no microcíticos diagnosticados. Aquellos pacientes con enfermedad considerada como “irresecable”, o que aún siendo candidatos a resección quirúrgica, la rechacen o no se encuentren en condiciones de superarla, son tratados habitualmente mediante radioterapia y/o quimioterapia<sup>28</sup>.

Los pacientes que presentan tumores de células pequeñas suelen tratarse mediante una terapia combinada de quimioterapia y radioterapia en aquellos casos en que la enfermedad está limitada, el 30% de los diagnosticados, con una tasa de supervivencia a los cinco años del 25% aproximadamente. Sin embargo, cuando la enfermedad está extendida raramente es curable y se trata con quimioterapia paliativa. El empleo de la cirugía en estos tumores es controvertido y, aunque puede utilizarse para la resección curativa del nódulo pulmonar solitario con quimioterapia adyuvante, y para la resección de la enfermedad residual tras el tratamiento combinado en la

enfermedad limitada, en la actualidad no esta recomendada como tratamiento de rutina para los pacientes con tumores de células pequeñas<sup>29</sup>.

## **1.4 Biología molecular del cáncer de pulmón**

Durante la última década se ha producido un enorme avance en nuestro conocimiento acerca de las alteraciones moleculares que participan en la iniciación y progresión del cáncer de pulmón. Las alteraciones moleculares en las células neoplásicas suponen la adquisición de nuevas características que les confieren mayor agresividad, resistencia al tratamiento y/o capacidad de invasión y metástasis. No obstante, los estudios moleculares realizados en distintos marcadores aún no han logrado desplazar a los factores clínico-patológicos en el diagnóstico, evaluación del pronóstico e indicación del tratamiento.

### **1.4.1 Predisposición genética**

Existen múltiples factores que determinan la susceptibilidad individual a desarrollar cáncer de pulmón tras la exposición mantenida al humo del tabaco. Probablemente, la predisposición genética es muy importante si consideramos que sólo el 10%-20% de los fumadores desarrollarán cáncer de pulmón<sup>30</sup>. La agregación familiar se ha observado con la aparición de más casos de cáncer de pulmón en familias de pacientes afectados por esta enfermedad. Los análisis de segregación que se han realizado sugieren un patrón hereditario autosómico dominante que podría explicar el desarrollo temprano de la enfermedad, aunque esto sólo explicaría un pequeño número de casos de pacientes con cáncer de pulmón con más casos de cáncer de pulmón en la historia familiar<sup>31</sup>.

Se han identificado alrededor de 4.000 sustancias químicas en el humo del tabaco de las que más de sesenta se han identificado como carcinógenos. Los carcinógenos más potentes identificados son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), las nitrosaminas y las aminas aromáticas. Sin embargo, los carcinógenos más relacionados con el desarrollo del cáncer de pulmón son los PAHs como el benzopireno, la nitrosamina denominada nitrosaminocetona derivada de la nicotina, y la nicotina en

condiciones de hiperoxia<sup>32</sup>. El proceso de carcinogénesis implica la activación de los carcinógenos que van a permitir la formación de aductos en el DNA, que normalmente van a ser eliminados por los mecanismos de reparación del DNA. Sin embargo, polimorfismos que afecten a la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de los carcinógenos del tabaco y en la reparación del DNA, pueden afectar al riesgo de padecer cáncer de pulmón<sup>31</sup>.

El riesgo de padecer cáncer de pulmón y los polimorfismos de las enzimas implicadas en el metabolismo de los carcinógenos del tabaco se han estudiado principalmente en la familia del citocromo P450 (CYP) y la glutatión S-transferasa (GST) entre otros, implicadas en la fase I y II, respectivamente, de la detoxificación de sustancias tóxicas para el organismo. Los estudios realizados hasta la fecha han encontrado asociaciones entre el riesgo de padecer cáncer de pulmón y distintos polimorfismos de la familia del CYP como CYP1A1 Msp 1, CYP1A1 Ile-Val, CYP2A6, CYP2C9 y CYP2C19, así como otros polimorfismos de la familia del GST como GSTM, GSTT1 y GSTP1. Además, la combinación de estos polimorfismos genéticos implicados en la fase I y II de la detoxificación de sustancias tóxicas, parece estar implicada en un aumento del riesgo de padecer cáncer de pulmón<sup>33</sup>.

#### **1.4.2 Detección precoz e implicaciones diagnósticas**

El conocimiento de la evolución molecular del cáncer de pulmón es crucial para la puesta a punto y optimización de técnicas para su detección precoz y diagnóstico. El cáncer de pulmón se desarrolla a partir de distintas lesiones precursoras que acumulan alteraciones genéticas en células somáticas preneoplásicas hasta que finalmente, por expansión clonal, se convierten en tumores con capacidad invasiva. Distintos cambios morfológicos preneoplásicos, como la hiperplasia, metaplasia, displasia y carcinoma *in situ*, pueden observarse en el epitelio bronquial antes del desarrollo del tumor. Estas lesiones precursoras e incluso el tejido sano adyacente al tumor contienen alteraciones genéticas idénticas a las alteraciones de las células tumorales<sup>31</sup>.

Los análisis mediante microdissección de lesiones precursoras en pacientes con carcinoma escamoso, sugieren un modelo secuencial de pérdidas cromosómicas en la

región 3p, posteriormente en la 9p, 8p, 19p, 5q y mutaciones en RAS. No obstante, esto puede ser muy heterogéneo<sup>31</sup> ya que, en lesiones precursoras del adenocarcinoma, la mutación de K-RAS es un evento precoz<sup>30</sup>. Sin embargo, mutaciones en p53, implicado en la parada del ciclo celular y en la inducción de apoptosis, son características de los carcinógenos del humo del tabaco y no solamente se encuentran en el 100% de los tumores de pulmón, sino también en tejido sano de fumadores habituales, indicando un daño específico realizado por estos carcinógenos, y en lesiones precancerosas como la metaplasia escamosa (8%), la displasia leve (38%), la displasia moderada (13%), la displasia severa (94%) y el carcinoma *in situ* (55%). Por lo tanto, la pérdida de la función de p53 parece un requisito imprescindible desde los primeros momentos de la tumorigénesis pulmonar<sup>34</sup>.

El conocimiento de los cambios moleculares presentes en las lesiones preneoplásicas nos puede permitir utilizar nuevas estrategias para el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón. Así, tanto en biopsias bronquiales como en el esputo de pacientes sin evidencia clínica de carcinoma, se ha detectado la presencia de mutaciones de K-RAS y p53, implicadas en la activación de la división celular y la regulación del ciclo celular y apoptosis respectivamente, hipermetilación de promotores de genes supresores de tumores, como p16 y MGMT, inestabilidad de microsatélites y alta actividad de la enzima telomerasa, implicada en la inmortalidad celular<sup>30,31</sup>.

### **1.4.3 Marcadores Pronósticos**

Los sistemas de estadificación clínico-patológica son los que mejor predicen el pronóstico del paciente en el cáncer de pulmón, aunque no poseen la suficiente discriminación para definir de forma individualizada el curso de la enfermedad para cada paciente. Así, además de la estadificación, el tipo histológico es un factor decisivo en la indicación del tratamiento.

Durante los últimos años, se está realizando un gran esfuerzo para conocer qué marcadores moleculares de los descritos pueden ser útiles para predecir mejor el pronóstico de cada paciente. No obstante, el uso de marcadores moleculares como factores pronósticos no se ha generalizado debido a los resultados discordantes de la

literatura<sup>30</sup>. Citaremos como ejemplo algunas series recientes en las que se estudian diferentes marcadores moleculares para ilustrar estas discrepancias. La expresión del proto-oncogen BCL2, que impide la apoptosis celular, es mayor en pacientes con tumores del tipo células pequeñas (75%-95%) que en tumores no microcíticos. Sin embargo, estos tumores son más sensibles a la quimioterapia, que induce una respuesta apoptótica. Por otro lado, la expresión de BCL2 en tumores del tipo no microcítico predice un aumento de la supervivencia<sup>35</sup>, por lo que actualmente el valor pronóstico de BCL2 es controvertido<sup>36</sup>.

KRAS, miembro de la familia del proto-oncogen RAS, cuya alteración puede permitir la proliferación celular, se ha encontrado en el 15%-20% de los tumores del tipo no microcítico, especialmente en adenocarcinomas (20%-30%). Sin embargo, su importancia en el pronóstico del cáncer de pulmón no se ha podido establecer, ya que dos estudios recientes demostraron que las mutaciones de KRAS son independientes pero débiles en la predicción de supervivencia<sup>37,38</sup>.

#### **1.4.4 Marcadores Moleculares Predictivos de la Respuesta al Tratamiento y como Dianas Terapéuticas**

Los marcadores moleculares pueden ser utilizados como factores predictivos de la respuesta al tratamiento quimioterápico y radioterápico o como dianas terapéuticas. La expresión de MYC, que codifica para proteínas nucleares, se ha observado en pacientes con tumores del tipo células pequeñas tratados con quimioterapia, lo que se ha correlacionado con una disminución en la supervivencia. Por otro lado, mutaciones en p53 se han asociado a la respuesta a quimioterapia basada en el tratamiento con cisplatino y a la respuesta al tratamiento con radioterapia<sup>31</sup>. También se ha demostrado que los carcinomas de pulmón con mutaciones en el gen de la  $\beta$ -tubulina son resistentes al tratamiento con paclitaxel<sup>39</sup>.

El aumento del conocimiento de la biología molecular del cáncer de pulmón ha permitido en los últimos años la incorporación de nuevas terapias biológicas frente a dianas tumorales, con menor toxicidad que la quimioterapia convencional. El erlotinib (Tarceva<sup>TM</sup>, Genentech/OSI Pharmaceuticals) y el gefitinib (Iressa<sup>TM</sup>, AstraZeneca) han

sido aprobados en los últimos años para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico en estadios avanzados. Estos fármacos tienen como dianas de su acción al receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR). La mayoría de este tipo de tumores expresan este receptor que va a mediar en la transducción de señales al núcleo asociadas al aumento de la proliferación celular, la angiogénesis y la disminución de la apoptosis<sup>28,40</sup>.

Sin embargo, ninguno de estos fármacos ha demostrado un mayor aumento de la supervivencia en los pacientes tratados con ellos en primera línea de quimioterapia, excepto para una subpoblación de pacientes no fumadores tratados con erlotinib, que mostraron una mayor probabilidad de supervivencia (23 meses), respecto a aquellos tratados con placebo (10 meses). A pesar de esto, la FDA autoriza el uso de este fármaco sólo en segunda o tercera línea de quimioterapia donde sí se ha observado un beneficio en la supervivencia de los pacientes tratados con él (2.3 meses) respecto a aquellos pacientes tratados con placebo (1.84 meses). El gefitinib no ha demostrado ningún beneficio en la supervivencia en aquellos pacientes tratados con este fármaco. Actualmente, se revisa su utilidad en el tratamiento del cáncer de pulmón avanzado del tipo no microcítico y la FDA recomienda su uso sólo en aquellos pacientes que ya hayan iniciado el tratamiento con este fármaco y su médico piense que van a obtener un beneficio de su uso<sup>28,40</sup>.

El futuro de los pacientes con cáncer de pulmón pasa por la identificación de marcadores moleculares que orienten sobre el diagnóstico precoz, el pronóstico y la mejor opción terapéutica a administrarles, junto con el desarrollo de nuevos fármacos que combinados con otros o con los tratamientos quimioterápicos convencionales, posean una menor toxicidad y permitan mantener una terapia a lo largo del tiempo para evitar recurrencias, además de aumentar la probabilidad de supervivencia de los pacientes.

## 1.5 Angiogénesis y Linfangiogénesis Tumoral

Los primeros en utilizar la expresión “angiogénesis tumoral” fueron Greenblatt y Shubik<sup>41</sup> a finales de los años sesenta. Sus estudios, junto con los realizados por Algire<sup>42</sup> y Warren<sup>43</sup> y los trabajos de Judah Folkman<sup>44,45</sup>, en los años setenta, establecieron las primeras hipótesis sobre la importancia de la angiogénesis tumoral o neoangiogénesis en el desarrollo y diseminación metastática de los tumores y la importancia de la inhibición de este proceso como nueva forma de abordar el tratamiento del cáncer<sup>46,47</sup>.

Hoy conocemos que los fenómenos de progresión tumoral, invasión y metástasis que conducen a la malignización neoplásica van a depender de este proceso<sup>48</sup>, que va a ser regulado principalmente por las células tumorales, aunque también participan células del estroma tumoral como leucocitos<sup>49-51</sup> y fibroblastos<sup>52-54</sup>.

El mecanismo por el cual se va a llevar a cabo el proceso de neoangiogénesis implica en primer lugar la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos y la disgregación localizada de la matriz extracelular por metaloproteasas de la matriz (MMPs)<sup>55</sup>, posteriormente la migración de células endoteliales al espacio intersticial y su proliferación, para finalmente completarse el proceso con la remodelación de la estructura capilar y el depósito de una nueva matriz extracelular<sup>56</sup> (figura 3).

La neoangiogénesis determina un aumento de la densidad microvascular intratumoral y del fluido sanguíneo, y es esencial para el desarrollo tumoral a partir de 1-2 mm<sup>3</sup> del tamaño del tumor<sup>48</sup>. Los nuevos vasos formados mediante neoangiogénesis muestran de forma característica un endotelio incompleto y una membrana basal fragmentada. Por todo ello, el alto grado de vascularización de un tumor, junto con el crecimiento rápido de determinados clones que lo conforman y la existencia de barreras más débiles, son los factores que condicionan la malignización neoplásica en base a una mayor tumorogenicidad y un mayor potencial metastático del tumor<sup>57-59</sup>.



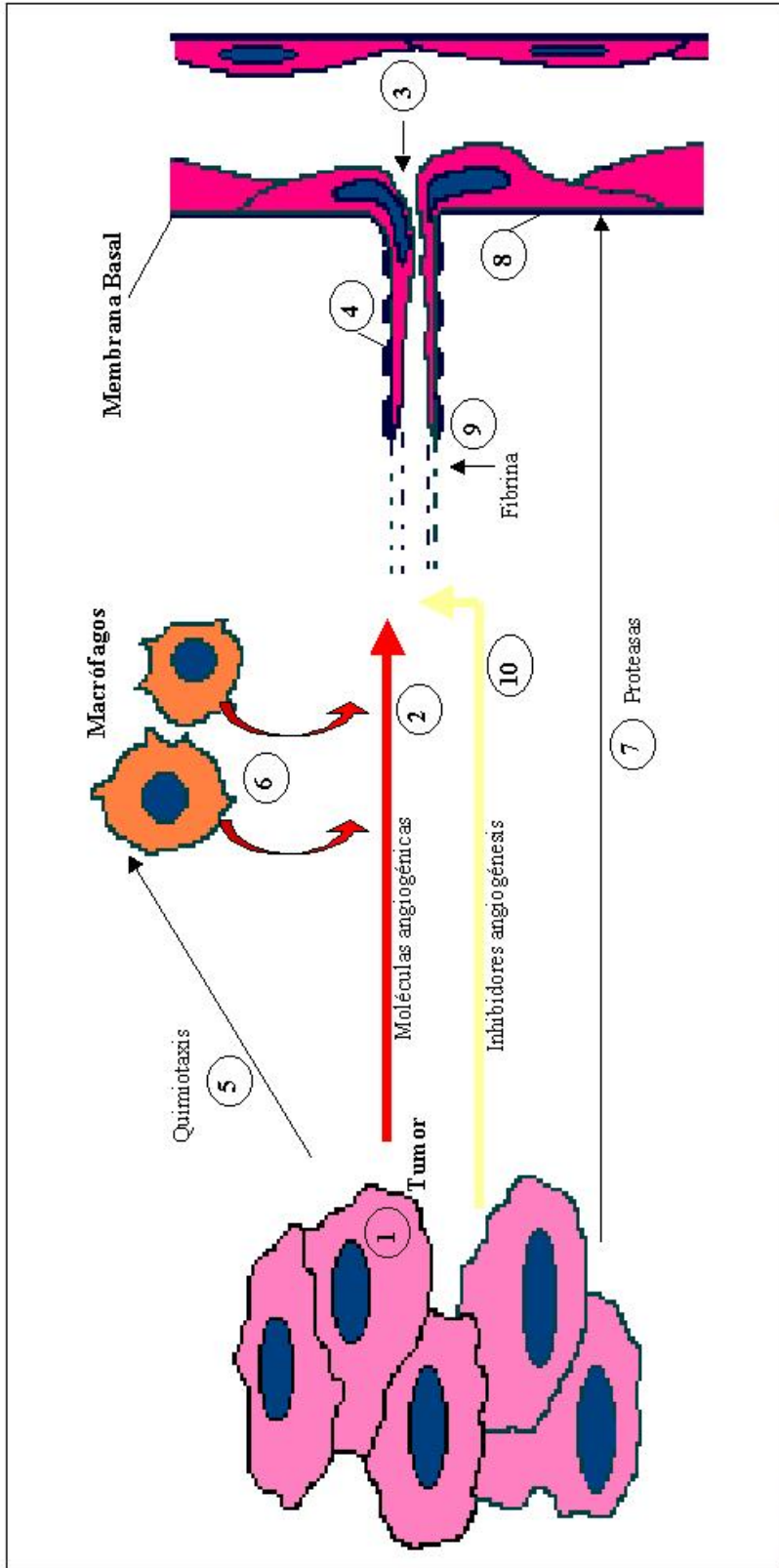


Figura 3.- Diagrama sobre el mecanismo de adquisición del Fenotipo angiogénico tumoral. (Adaptado de Folkman & Shing<sup>65</sup>)

1. Secreción de moléculas pro-angiogénicas por las células tumorales.
2. Difusión de las moléculas angiogénicas por el tejido para alcanzar la vasculatura pre-existente.
3. Estimulación de la migración y quimiotaxis de las células endoteliales por las moléculas angiogénicas.
4. Activación de proteasas por parte de las moléculas angiogénicas para la degradación de la membrana basal de la vasculatura pre-existente.
5. Reclutamiento de macrófagos por parte del tumor.
6. Liberación de moléculas pro-angiogénicas por parte de los macrófagos reclutados.
7. Liberación de proteasas por parte de las células tumorales que van a producir la degradación de la membrana basal de la vasculatura pre-existente.
8. Movilización por parte de proteasas de moléculas pro-angiogénicas retenidas en la matriz extracelular.
9. Incremento de la permeabilidad de los nuevos capilares formados y liberación de sustancias relacionadas con la fibrina en el espacio intercelular.
10. Disminución de la liberación de moléculas inhibidoras de la angiogénesis previa a la liberación de moléculas angiogénicas.

El desarrollo tumorigénico de una célula implica la expresión de un fenotipo angiogénico, en el que la suma de las actividades de las moléculas que expresa y secreta le permitan inducir el proceso de neoangiogénesis, en tejidos donde sólo existen vasos normales quiescentes. Las células tumorales adquieren la capacidad angiogénica durante las etapas previas al desarrollo de las lesiones tumorales<sup>60-63</sup>. Sin embargo, el fenotipo angiogénico se manifiesta gradualmente durante la progresión tumoral, y se empieza a detectar a mitad de camino del proceso gradual de ajuste de niveles entre factores inductores e inhibidores, no sólo el aumento de los factores pro-angiogénicos es suficiente para que las células tumorales adquieran la capacidad angiogénica<sup>56,64</sup> (tabla 3).

| <b>Moléculas Inductoras de la Angiogénesis</b>                              | <b>Moléculas Inhibidoras de la Angiogénesis</b>   |
|---|---|
| * Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico: FGFb                        | * Endostatina                                     |
| * Factor de Crecimiento de Fibroblastos Ácido: FGFa                         | * Angioestatina                                   |
| * Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular: VEGF                        | * Somatostatina y análogos                        |
| * Factor de Crecimiento de Célula Endotelial derivado de Plaquetas: PD-ECGF | * Tromboespondina 1: TSP-1                        |
| * Factor de Crecimiento Tumoral Alfa: TGF $\alpha$                          | * Interferones: INF $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ |
| * Factor de Crecimiento Tumoral Beta: TGF $\beta$                           | * Interleucinas: IIs                              |
| * Angiogenina   |   |
| * Factor de Necrosis Tumoral Alfa: TNF $\alpha$                             |   |

**Tabla 3.-** Factores inductores e inhibidores de la angiogénesis (referencias 56 y 65).

El proceso de linfangiogénesis tumoral es menos conocido que el de neoangiogénesis, debido principalmente a la menor atención dedicada al estudio del sistema linfático durante las últimas décadas respecto al sistema sanguíneo. Sin embargo, los estudios llevados a cabo en los últimos cinco años, que relacionan la expresión de factores de crecimiento linfangiogénicos por parte de los tumores con el desarrollo de vasos linfáticos y su diseminación a través de estos, ha conseguido aumentar el interés por su estudio<sup>66-69</sup>.

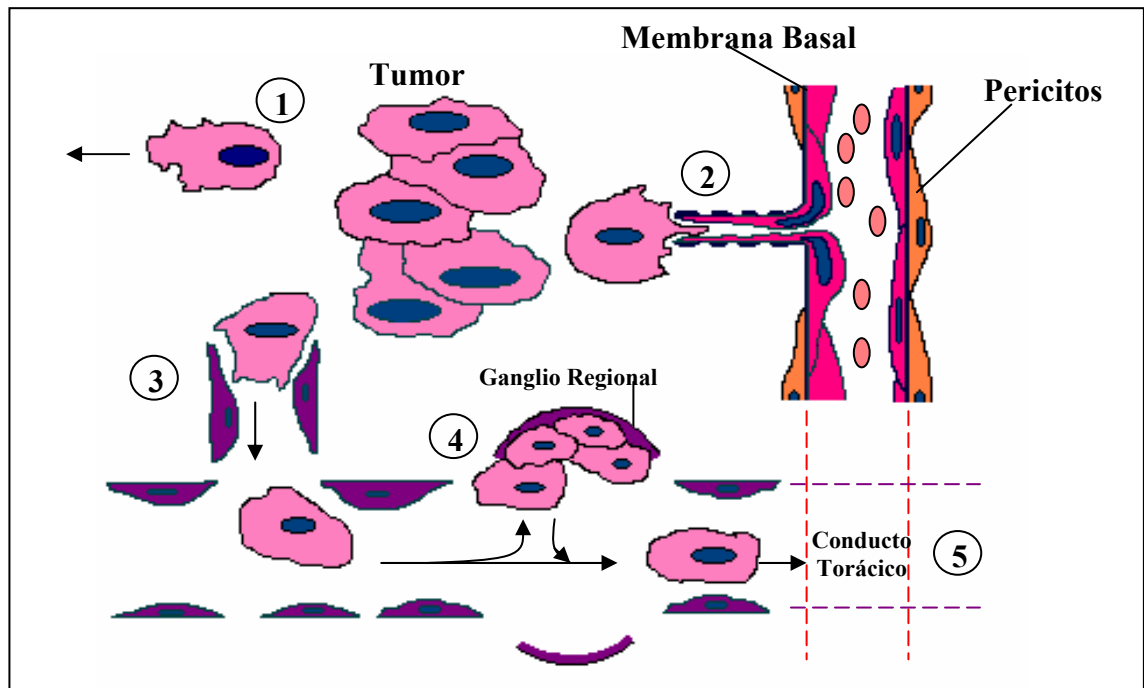
La diseminación a los ganglios regionales es el primer paso en la diseminación de los tumores a otras localizaciones. Los capilares linfáticos, al contrario que los sanguíneos, van a tener un diámetro mayor ( $\approx 100 \mu\text{m}$ ) y están formados por una fina línea de células endoteliales sin membrana basal, con débiles uniones y grandes fenestraciones entre ellas. Una vez la linfa es recogida de los tejidos por estos capilares, pasa al menos por un ganglio linfático para acabar finalmente, a través del conducto torácico, en la circulación venosa<sup>70</sup>. Todo esto permite que la diseminación tumoral a través del sistema linfático sea más rápida y sencilla que a través del sistema sanguíneo, lo que hace que la diseminación de células tumorales a ganglios regionales sea uno de los primeros eventos en el proceso de metastatización del tumor<sup>71</sup> (figura 4).

Actualmente, la neoangiogénesis es uno de los principales campos de investigación para el desarrollo de terapias que frenen el desarrollo del cáncer y en especial el del cáncer de pulmón. Multitud de inhibidores del proceso angiogénico están en distintas fases de estudio y desarrollo (tabla 4).

| Agente Biológico                    | Fase de ensayo clínico | Actividad*                      | Referencia |
|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------|
| Bevacizumab (Avastin™, Genetech)    | III                    | Anticuerpo monoclonal anti-VEGF | 72         |
| Sofarenib (Bayer)                   | III                    | Inhibidor VEGFR2, PDGFR, c-Kit  | 73         |
| ZD6474 (AstraZeneca)                | II                     | Inhibidor VEGFR2 y EGFR         | 74 y 75    |
| SU-11248 (Pfizer)                   | I/II                   | Inhibidor VEGFRs, PDGFR, c-Kit  | 76 y 77    |
| AG-013736 (Agouron Pharmaceuticals) | II                     | Inhibidor VEGFRs y PDGFR        | 78         |
| AZD2171 (AstraZeneca)               | I                      | Inhibidor VEGFR2                | 79         |
| VEGF Trap (Regeneron)               | I                      | Inhibidor VEGF                  | 80         |

**Tabla 4.-** Agentes biológicos inhibidores de la angiogénesis tumoral.

*VEGF*.- Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular; *VEGFR*.- Receptor para el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular; *EGFR*.- Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico; *PDGFR*.- Receptor para el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.



**Figura 4.-** Diagrama sobre la estructura de los vasos sanguíneos y linfáticos que rodean el tumor y los diferentes tipos de diseminación tumoral.

1. Diseminación al tejido circundante e invasión de vasos sanguíneos y linfáticos pre-existentes.
2. Diseminación vía sistema sanguíneo, tras la formación de nuevos vasos (angiogénesis).
3. Diseminación vía sistema linfático, tras la formación de nuevos vasos (linfangiogénesis).
4. Invasión de ganglios regionales a través del sistema linfático.
5. Diseminación al sistema sanguíneo a través del conducto torácico.

El Bevacizumab (Avastin<sup>TM</sup>, Genetech), un anticuerpo monoclonal anti-VEGF, aprobado en el año 2004 por la FDA y la agencia nacional del medicamento, para el tratamiento en primera línea de pacientes con carcinoma metastático de colon o recto<sup>81</sup>, ha sido recientemente el primer agente biológico que ha demostrado un aumento de la probabilidad de supervivencia para el tratamiento en primera línea de los pacientes con cáncer de pulmón, del tipo no microcítico en estadios avanzados, en combinación con quimioterapia convencional<sup>72</sup>. Este hecho, se considera como uno de los avances más importantes en los últimos tiempos, en el tratamiento del cáncer de pulmón.

## 1.6 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), también llamado factor de permeabilidad vascular (VPF), es uno de los factores angiogénicos más potentes conocido hasta la fecha, siendo el único factor de distribución ubicua en zonas de angiogénesis y cuyos niveles se correlacionan estrechamente en tiempo y espacio con fases del crecimiento de vasos sanguíneos<sup>64</sup>. Senger y cols.<sup>82</sup> fueron los primeros en

purificar parcialmente esta proteína en 1983, aunque hasta 1989 no fue aislada completamente, por los grupos de Ferrara<sup>83</sup> y Connelly<sup>84</sup>.

### **1.6.1 Estructura y Función**

El VEGF es una glicoproteína homodimérica de unión a heparina, estructuralmente relacionada con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>85-87</sup>.

La principal fuente de VEGF la constituyen las plaquetas y los neutrófilos circulantes. Sin embargo, en pacientes con cáncer, este polipéptido puede ser liberado tanto por las células tumorales como por los macrófagos<sup>50</sup> y fibroblastos<sup>52,54</sup> que infiltran el tumor.

El VEGF resulta esencial durante los procesos de vasculogénesis y angiogénesis embrionaria. Los estudios realizados en ratones, indican que la pérdida de un solo alelo del gen o la inhibición de VEGF produce deficiencias en la vascularización que son incompatibles con la vida<sup>88-91</sup>. También se ha demostrado esencial para el crecimiento longitudinal de los huesos, ya que la inhibición de VEGF impide este proceso<sup>92,93</sup>. Además, VEGF y su función angiogénica son imprescindibles en el desarrollo normal del ciclo ovárico y la función endometrial<sup>94</sup>.

VEGF induce la proliferación, migración y formación del endotelio capilar por parte de las células endoteliales<sup>95</sup>. Originalmente se le identificó como un factor de hiperpermeabilidad vascular, promoviendo el incremento del filtrado microvascular que a su vez ocasiona una infiltración de proteínas del plasma<sup>96</sup> y, posteriormente, como una proteína con potente actividad mitogénica y específica para el endotelio vascular<sup>97</sup>. Además, se ha visto que VEGF causa vasodilatación a través de la inducción de la proteína óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)<sup>98,99</sup> y, que también es un potente inhibidor de la apoptosis de las células endoteliales, mediante la inducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas<sup>100,101</sup>.

Sin embargo, aunque VEGF actúa principalmente sobre las células endoteliales, también se ha observado que induce la movilización de células madre hematopoyéticas

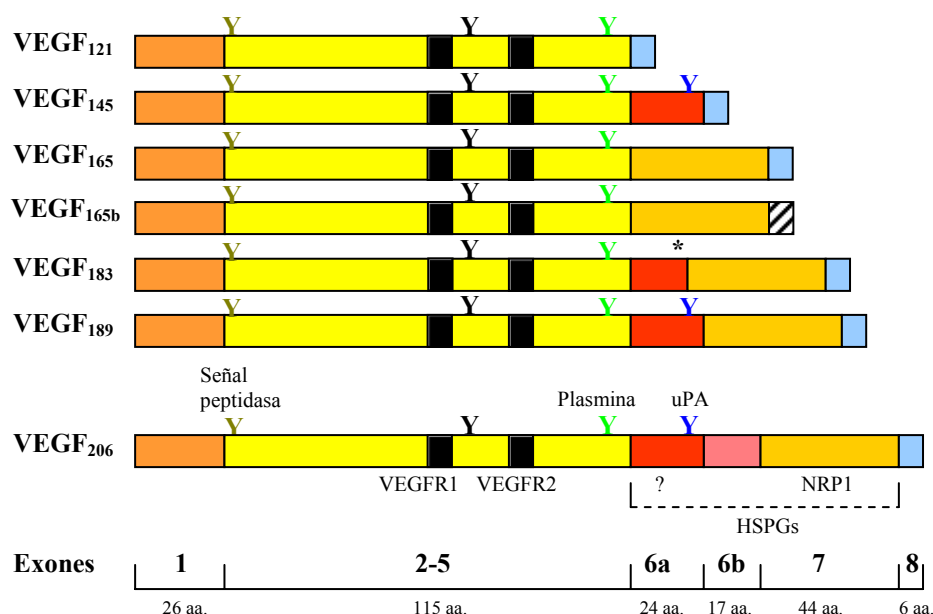
desde la médula ósea, la quimiotaxis de monocitos, la formación de hueso mediada por osteoblastos y la protección neural<sup>95,102</sup>. Además, VEGF estimula la migración de células inflamatorias y la expresión de proteasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular en la angiogénesis<sup>103-105</sup>.

### 1.6.2 El gen VEGF y sus isoformas

El gen humano del VEGF se localiza en el cromosoma 6p21.3<sup>106</sup> y presenta un tamaño de 14 kb. Está constituido por ocho exones separados por siete intrones y durante el proceso de exclusión de intrones (*splicing* alternativo)<sup>107,108</sup>, para la generación del mRNA funcional, la presencia o ausencia de secuencias codificadas por los exones 6 y 7 condiciona la generación de seis isoformas alternativas del mRNA (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>) que varían en tamaño, desde 121 a 206 aminoácidos<sup>97,107-110</sup>.

La isoforma VEGF<sub>121</sub> carece de los exones 6 y 7; la isoforma VEGF<sub>145</sub> no tiene el exón 7 y contiene sólo una secuencia de veinticuatro aminoácidos del exón 6; la isoforma VEGF<sub>165</sub> carece del exón 6; la isoforma VEGF<sub>183</sub> contiene sólo una secuencia de dieciocho aminoácidos del exón 6; la isoforma VEGF<sub>189</sub> contiene sólo una secuencia de veinticuatro aminoácidos del exón 6 y la isoforma VEGF<sub>206</sub> contiene el exón 6 completo (figura 5).

Los exones 6 y 7 confieren afinidad a la heparina<sup>109</sup>. Esto hace que la isoforma VEGF<sub>121</sub> no se una a heparina al carecer de éstos<sup>111</sup>, mientras que el 50-70% de la isoforma VEGF<sub>165</sub>, al liberarse, interacciona con proteoglicanos heparan-sulfato de la célula y la matriz extracelular<sup>112</sup>. Las isoformas VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> se van a unir fuertemente a heparina, quedando secuestradas completamente a la matriz extracelular y en menor grado a la superficie celular<sup>112,113</sup>. Por otro lado, el exón 6 contiene una secuencia de veinticuatro aminoácidos identificada como una secuencia consenso de retención de superficie celular que permite la unión de las isoformas VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>, a componentes de la matriz extracelular independientemente de la capacidad de unión a heparina<sup>109</sup>.



**Figura 5.-** Representación esquemática de las isoformas del gen VEGF generadas por reordenamiento alternativo para la generación del mRNA funcional.

Se muestran los lugares de interacción con los receptores para VEGF (VEGFRs), el receptor de neuropilinas (NRP1) y a proteoglicanos heparan-sulfato (HSPG). (Adaptado de Robinson y cols.<sup>118</sup>).

\*.- No se conoce si el lugar de interacción con uPA en VEGF<sub>183</sub> se pierde por el truncamiento del exón 6.  
 Y.- Indica el posible lugar donde se produce la N-glicosilación, requerido para la eficiente secreción de VEGF.

?.- Representa el posible lugar de unión a diferentes componentes de la superficie y matriz extracelular.

Las isoformas de VEGF que quedan retenidas en la matriz extracelular van a constituir un reservorio de este factor de crecimiento que puede ser liberado lentamente en respuesta a estímulos como heparina, heparan sulfatos y heparinasas, así como, más rápidamente, por enzimas proteolíticas específicas como la plasmina y el activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA)<sup>112,114</sup>.

Las isoformas VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub> y VEGF<sub>189</sub> son expresadas preferentemente por la mayoría de las células productoras de VEGF, mientras que la expresión de las isoformas VEGF<sub>145</sub> y VEGF<sub>206</sub> queda restringida a las células derivadas de la placenta<sup>115</sup>. Actualmente, se desconoce el papel e importancia de las distintas isoformas, pero parecen tener distintas propiedades biológicas<sup>116</sup>.

Recientemente se ha identificado una nueva isoforma, VEGF<sub>165b</sub>, que carece del exón 6 como VEGF<sub>165</sub> y sufre la sustitución de los seis aminoácidos codificados por el exón 6 por otros diferentes, por lo que contiene el mismo número de aminoácidos que

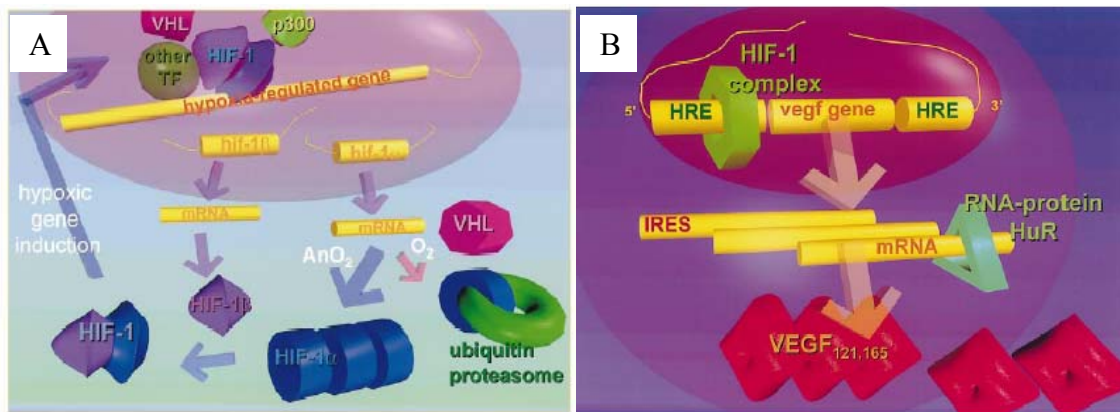
VEGF<sub>165</sub> con la que tiene un 96% de homología. Sin embargo, esta nueva isoforma parece inhibir la acción de VEGF<sub>165</sub> de manera competitiva<sup>117</sup>.

### 1.6.3 Regulación de la expresión de VEGF

La expresión del gen VEGF está fuertemente regulada por el grado de hipoxia<sup>119,120</sup>, siendo el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) el principal mediador de la respuesta. El gen VEGF posee en su región promotora un dominio de respuesta a hipoxia, que contiene una zona de unión para el heterodímero formado por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de HIF-1, que induce un rápido y potente efecto inductor de los niveles del mRNA para VEGF, especialmente alrededor de las áreas necróticas de los tumores. Las bajas concentraciones de oxígeno van a regular HIF-1 de manera post-transcripcional, impidiendo su degradación constitutiva y aumentando su capacidad de unión al DNA<sup>121,122</sup>. Además, la hipoxia va a permitir un incremento de la estabilidad del mRNA del gen VEGF, que en condiciones de normoxia tiene una vida media de 30-60 minutos, mediante la proteína de unión a RNA denominada HuR<sup>120,123-125</sup> (figura 6).

Por otro lado, la expresión del mRNA para VEGF puede ser también inducida por citoquinas y factores de crecimiento como COX-2, PDGF, TNF $\alpha$ , TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , FGF4, EGF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, entre otros, muchos de ellos sin una actividad directa sobre la angiogénesis. Además, el gen VEGF puede ser regulado por la acción de las hormonas femeninas, por los receptores X del hígado, por retinoides y proteínas de la familia STAT<sup>126,127</sup>. Otras alteraciones específicas involucradas en el proceso de transformación celular como son mutaciones de p53, cambios en la metilación de p16, amplificación o mutación de RAS, sobreexpresión de p73 o inactivación del gen VHL inducen también cambios en la expresión de VEGF<sup>126</sup>.





**Figura 6.-** A; Regulación del gen HIF-1. B; Regulación del gen VEGF por HIF-1 (Reproducido de Dachs y cols.<sup>121</sup>).

### 1.6.4 Proteínas relacionadas con VEGF

Además de las isoformas de VEGF descritas, la familia VEGF comprende otros seis miembros: el factor de crecimiento placentario (PLGF); VEGF-B; VEGF-C; VEGF-D; VEGF-E y VEGF-F. Todos ellos muestran una estructura común de ocho residuos conservados de cisteína y un modo común de dimerización, además de una estructura similar en los dominios de unión a los receptores a los que se une el VEGF, también denominado VEGF-A, para diferenciarlo del resto de los miembros de la familia<sup>115,118</sup>.

#### 1.6.4.1 Factor de crecimiento placentario, PLGF

El factor de crecimiento placentario fue identificado en un primer momento en la placenta, aunque también se expresa en el tejido cardíaco y pulmonar. El gen PLGF se encuentra en el cromosoma 14q24 es codificado por siete exones y conserva un 42% de homología con el gen VEGF-A. Actualmente, se conocen cuatro isoformas: PLGF-1; PLGF-2; PLGF-3 y PLGF-4. Las isoformas PLGF-2 y PLGF-4 contienen dominios de unión a heparina, mientras que las isoformas PLGF-1 y PLGF-3 carecen de estos dominios<sup>115</sup>.

La actividad de PLGF se relaciona directamente con la activación del proceso de angiogénesis sobre las células endoteliales o indirectamente induciendo la expresión de VEGF-A<sup>115</sup>. Además, *in vivo* se ha observado que PLGF y VEGF-A pueden

heterodimerizar, aunque la capacidad mitogénica de estos heterodímeros es inferior a los homodímeros formados por VEGF-A, lo que podría representar un mecanismo para modular la disponibilidad de VEGF-A<sup>118</sup>.

#### 1.6.4.2 VEGF-B

El gen VEGF-B humano se encuentra en el cromosoma 11q13, es codificado por ocho exones y conserva un 45% de homología con el gen VEGF-A. La región promotora de VEGF-B es diferente respecto a la del gen VEGF-A, lo que podría explicar las diferencias en su regulación a distintos estímulos, ya que pierde los dominios de interacción con HIF-1 impidiendo la regulación del gen VEGF-B por hipoxia. Actualmente, se conocen dos isoformas: VEGF-B<sub>167</sub> y VEGF-B<sub>186</sub>. 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<sup>115</sup>.

La isoforma VEGF-B<sub>167</sub> se expresa en la mayoría de los tejidos, aunque preferentemente en el tejido cardíaco y músculo esquelético y, en mayor porcentaje (80%) que la isoforma VEGF-B<sub>186</sub>, cuya expresión queda reducida a unos pocos tejidos<sup>115</sup>. 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<sup>128</sup>. Además, se ha observado que ambas isoformas de VEGF-B pueden heterodimerizar con VEGF-A, lo que en el caso de VEGF-B<sub>167</sub> podría representar un mecanismo para modular la liberación y disponibilidad de VEGF-A, al interaccionar estos heterodímeros con la matriz extracelular<sup>118</sup>. Su expresión en distintos tipos de tumores se ha visto relacionada con la angiogénesis tumoral<sup>129</sup>.

#### 1.6.4.3 VEGF-C

El gen VEGF-C humano se encuentra en el cromosoma 4q34, es codificado por siete exones y conserva un 30% de homología con el gen VEGF-A<sub>165</sub><sup>115</sup>. El promotor

del gen VEGF-C contiene sitios de unión a NF- $\kappa$ B que podrían inducir la expresión del mRNA de VEGF-C por medio de citoquinas proinflamatorias<sup>130</sup>. VEGF-C es sintetizada como una proteína precursora con dos subunidades de 31 y 29 KDa, unidas mediante puentes disulfuro, que se activa proteolíticamente en el medio extracelular mediante plasmina y otras proteasas, para generar una proteína homodimérica de 21 KDa sin uniones disulfuro<sup>131</sup>.

VEGF-C se ha encontrado expresada en el tejido cardíaco, en el intestino delgado, en la placenta, en el ovario y la glándula tiroidea. VEGF-C va a inducir la mitosis, migración e inhibición de la apoptosis en las células endoteliales<sup>115</sup>. La actividad de VEGF-C se ha observado preferentemente en la regulación de la linfangiogénesis y angiogénesis en el desarrollo embrionario, la linfangiogénesis y el mantenimiento de los vasos linfáticos en el tejido adulto y, la regulación de la linfangiogénesis, el control de la función inmune y el control del tráfico de leucocitos en procesos inflamatorios y tumorales<sup>66-68,128</sup>.

#### 1.6.4.4 VEGF-D

El gen VEGF-D humano se encuentra en el cromosoma Xp22.31, es codificado por ocho exones y conserva un 61% de homología con el gen VEGF-C y un 31% con el gen VEGF-A<sub>165</sub><sup>115</sup>. VEGF-D es sintetizada primeramente como una proteína precursora que se activa mediante el procesamiento proteolítico de los extremos N-terminal y C-terminal<sup>118</sup>. El gen VEGF-D se encuentra bajo el control del proto-oncogen c-FOS, por lo que también va a ser conocido como factor de crecimiento inducido por c-FOS (FIGF)<sup>132</sup>.

VEGF-D se ha encontrado expresado en multitud de tejidos incluyendo el endotelio vascular, el tejido cardíaco, el músculo esquelético, el pulmón y el intestino<sup>115</sup>. VEGF-D va a inducir la proliferación de las células endoteliales. La actividad de VEGF-D se ha observado preferentemente en la linfangiogénesis y angiogénesis fisiológica y patológica inducida por tumores<sup>69,133,134</sup>.

#### 1.6.4.5 VEGF-E

VEGF-E es un término colectivo para un grupo de proteínas que conservan una gran homología con VEGF-A. VEGF-E fue descubierto en el genoma del parapoxvirus (Orf virus) que infecta ovejas, cabras y ocasionalmente a humanos. La infección por este virus causa lesiones en la piel cuyas principales características son la proliferación y dilatación de capilares. Los distintos tipos de parapoxvirus codifican para distintas isoformas del VEGF-E, que es capaz de estimular la proliferación de las células endoteliales y la permeabilidad vascular<sup>115</sup>. La expresión de este factor de la familia del VEGF induce una fuerte respuesta angiogénica debido principalmente a la pérdida de los dominios de unión a heparina<sup>118</sup>.

#### 1.6.4.6 VEGF-F

Recientemente, un séptimo miembro de la familia del VEGF ha sido identificado en el veneno de varias víboras (*Vipera ammodytes ammodytes*, *Daboia russelli russelli*, *Vipera aspis aspis*, *Bothrops insularis*, *Bothrops jararaca*, *Macrovipera lebetina* y *Trimeresurus flavoviridis*). VEGF-F es un grupo de proteínas homólogas a VEGF, nombradas como vammina, VR-1, cuyas secuencias mantienen un 47,6% y 48,1% de homología con VEGF-A<sub>165</sub>, el factor hipotensivo (HF), svVEGF (VEGF aislado del veneno de *Bothrops insularis* y *Bothrops jararaca*), la proteína incrementadora de la permeabilidad capilar (ICCP) y TfsvVEGF (VEGF aislado del veneno de *Trimeresurus flavoviridis*)<sup>135,136</sup>. Los distintos VEGF-Fs contienen un corto dominio C-terminal de unión a heparina y el péptido del C-terminal de la vammina es capaz de bloquear la actividad de VEGF-A<sub>165</sub> *in vivo* e *in vitro*<sup>137,138</sup>. La vammina es capaz de estimular la proliferación de células endoteliales *in vitro* hasta dos veces más que VEGF-A<sub>165</sub>. TfsvVEGF se ha identificado como un factor débil a la hora de estimular la proliferación de las células endoteliales, pero un potente factor de hiperpermeabilidad comparable a VEGF-A<sub>165</sub>, al igual que svVEGF e ICCP. Actualmente, se busca en otras especies de víboras nuevas proteínas relacionadas y se estudia la estructura y actividad de las proteínas ya identificadas<sup>135,136</sup>.

### 1.6.5 Receptores de VEGF

Las proteínas de la familia del VEGF muestran afinidad y se unen a receptores que fundamentalmente pertenecen a la familia de los receptores tirosina-quinasa (TKR), en concreto a las subfamilias de receptores *flt* (*fms-like tyrosine kinase*) y de receptores con dominios receptores kinasa (KDR). Hasta hoy, se han descrito tres receptores de superficie celular que median los efectos del VEGF y de sus proteínas relacionadas: VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/Flk-1 y VEGFR3/Flt-4. Todos ellos tienen siete dominios homólogos del tipo inmunoglobinas extracelulares, una región transmembrana y un segmento intracelular conservado de tirosina-quinasa, que contiene una secuencia de inserción del tipo quinasa. Los tres receptores se han identificado en el endotelio vascular y linfático, implicados en su mantenimiento y en la diferenciación, proliferación y migración de las células endoteliales<sup>118</sup> (figura 7).

#### 1.6.5.1 VEGFR1/Flt-1

VEGFR1 es una glicoproteína codificada en el cromosoma 13q12-q13, con la mayor afinidad por VEGF-A (Kd: 10-30 pM) respecto al resto de receptores, y menor afinidad por PLGF, VEGF-B y TfsvVEGF (VEGF-F)<sup>118,128</sup>. La capacidad de VEGFR1 para transmitir señales mitogénicas al interior de la célula se ha observado débil, pero su heterodimerización con VEGFR2 produce señales más intensas que las producidas por los homodímeros de VEGFR1 y VEGFR2. La expresión de VEGFR1 va a estar regulada por factores angiogénicos y por hipoxia<sup>128</sup>.

VEGFR1, además de expresarse en células endoteliales, se ha observado expresada en pericitos, trofoblastos de la placenta, osteoblastos, macrófagos y en algunas células germinales hematopoyéticas<sup>57,128</sup>. La expresión de VEGFR1 en células germinales hematopoyéticas derivadas de la médula ósea, se ha visto recientemente relacionada con la formación de agregados celulares en lugares muy determinados, como el pulmón, donde posteriormente las células tumorales van a metastatizar<sup>139</sup>, y el reclutamiento de monocitos y células endoteliales progenitoras al tumor<sup>140,141</sup>. La presencia de VEGFR1 tanto en células endoteliales quiescentes como en células endoteliales proliferativas sugiere que participa en el mantenimiento del endotelio

vascular, como también en la angiogénesis y la arteriogénesis a través de monocitos<sup>57,128</sup>. Además, también se ha visto implicado en la regulación de la expresión del factor tisular, uPA y el inhibidor 1 del activador del plasminógeno en células endoteliales<sup>118</sup>. Por otro lado, en otros tipos celulares induce la liberación del factor tisular, la migración de monocitos, que va a depender del dominio quinasa intracelular<sup>128</sup>, y la liberación de metaloproteasas de matriz por las células musculares de la vasculatura<sup>118</sup>.

VEGFR1, también tiene una forma soluble (sVEGFR1) formada por seis dominios extracelulares, que es capaz de inhibir la acción de VEGF secuestrándolo y, formando heterodímeros con VEGFR2 incapaces de transducir señales al interior de la célula, tanto en modelos animales como en humanos<sup>118,128</sup>.

#### 1.6.5.2 VEGFR2/FIk-1

VEGFR2 es una glicoproteína codificada en el cromosoma 4q11-q12, con alta afinidad por VEGF-A (Kd: 75-760pM), y con menor afinidad por VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y VEGF-Fs<sup>128</sup>. Este receptor es el principal transmisor de señales de VEGF, para la inducción de vasodilatación, proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales<sup>115</sup>. La expresión de VEGFR2 se autorregula por los VEGFs y por hipoxia<sup>128</sup>.

VEGFR2, además de expresarse en células endoteliales, se ha descrito en neuronas, osteoblastos, células pancreáticas, células progenitoras de la retina, megacariocitos y en algunas células germinales hematopoyéticas<sup>128</sup>. Este receptor se expresa en el endodermo primitivo, en los angioblastos embrionarios y en los vasos sanguíneos, durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, en el tejido adulto sólo se encuentra en los vasos sanguíneos en formación y en algunos vasos linfáticos<sup>142</sup>. Además, VEGFR2 se ha visto asociada con la migración de las células endoteliales dependiente de integrinas<sup>128</sup>.

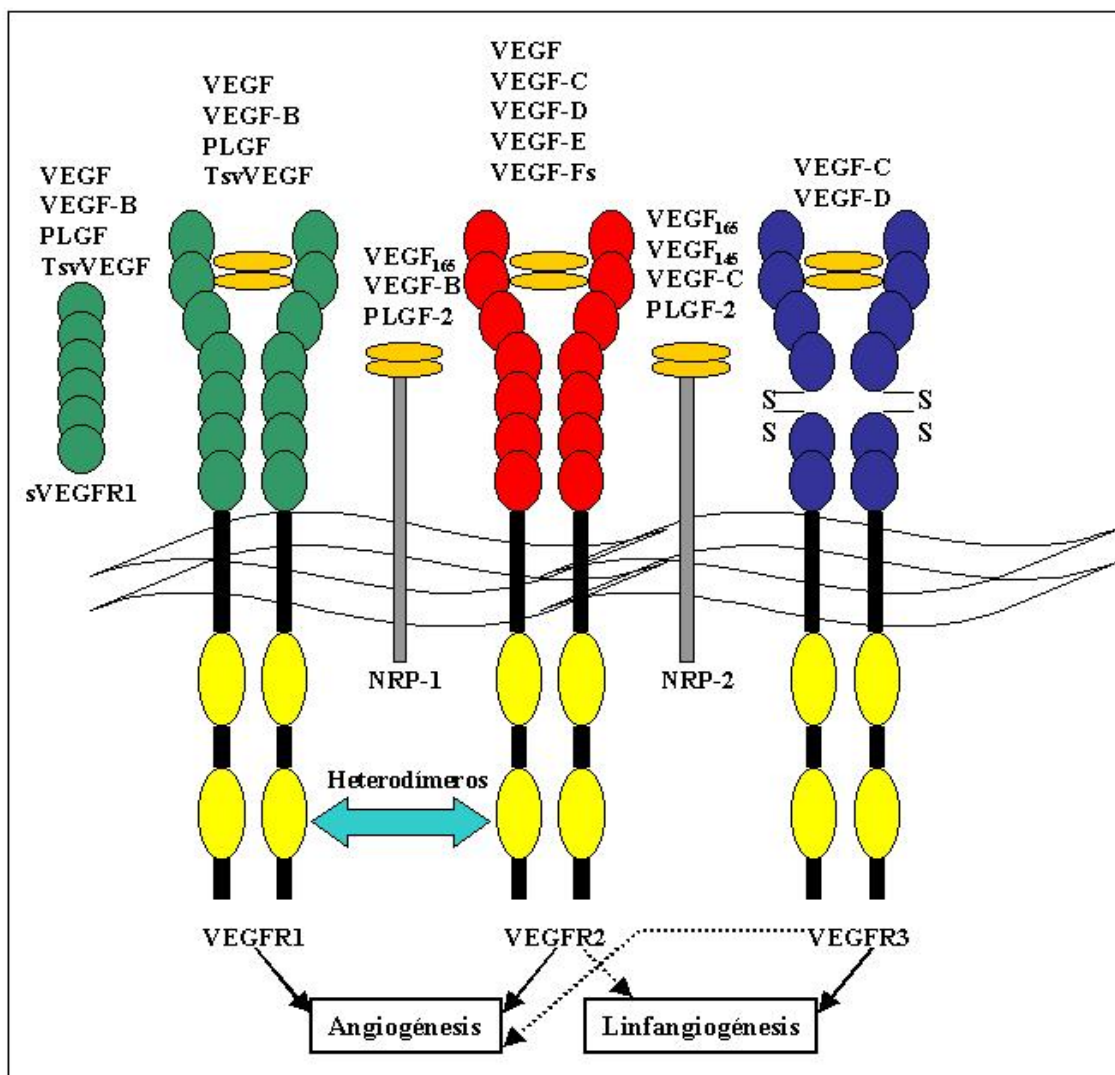


Figura 7.- Diagrama de las uniones de los ligandos de la familia del VEGF a los receptores.

### 1.6.5.3 VEGFR3/Flt-4

VEGFR3 es una glicoproteína codificada en el cromosoma 5q33-qter, con afinidad por VEGF-C, cuya forma mutante VEGF-C156S une a VEGFR3 pero no a VEGFR2<sup>142</sup>, y VEGF-D. Este receptor sólo contiene seis dominios de tipo inmunoglobulina, al ser liberado el quinto dominio proteolíticamente tras su biosíntesis y las cadenas resultantes unidas mediante puentes disulfuro. Existen dos isoformas de este receptor formadas por *splicing* alternativo, que difieren en el dominio C-terminal<sup>128</sup>. Este receptor está implicado en la proliferación, la migración y la supervivencia de las células endoteliales<sup>115</sup>.

VEGFR3 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 y, en condiciones patológicas, también en las células endoteliales del endotelio vascular de los tumores<sup>115,128</sup>.

#### 1.6.5.4 Neuropilinas (NRPs)

Un segundo grupo de receptores afines a VEGF son las neuropilinas, compuesto por la neuropilina 1 (NRP-1) y la neuropilina 2 (NRP-2), implicadas principalmente en el sistema inmune y el desarrollo neural, pero también en la angiogénesis formando parte de los complejos VEGFs/VEGFRs<sup>143</sup>. NRP-1 tiene afinidad por VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B y PLGF-2, actuando como co-receptor en las interacciones entre VEGF-A<sub>165</sub> y VEGFR2, y formando complejos con VEGFR1 aumentando la angiogénesis tumoral *in vivo*. NRP-2 tiene afinidad por VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF-C y PLGF-2, encontrándose expresada en las células endoteliales del sistema venoso y las células endoteliales del sistema linfático<sup>118,126</sup>.

### 1.6.6 Mecanismos de transducción de señales

El principal aspecto a destacar en cuanto a las distintas capacidades de los VEGFRs a la hora de transducir señales al interior de la célula, es que VEGFR2 y VEGFR3 tienen una actividad kinasa mayor que VEGFR1. Por otro lado, la actividad tirosina-kinasa de VEGFR1 es inusualmente baja para un receptor de este tipo, incluso diez veces menor que la de VEGFR2<sup>143</sup>. Estas características van a condicionar sus diferentes actividades biológicas.

#### 1.6.6.1 Vía VEGFR1/Flt-1

VEGFR1 desencadena débiles señales para la proliferación y supervivencia de las células endoteliales, así como para la migración de macrófagos. Este receptor contiene muchos residuos de tirosina en el dominio intracelular (Y1169, Y1213, Y1242, Y1327, Y1333) que se autofosforilan, permitiendo su interacción con otras proteínas,



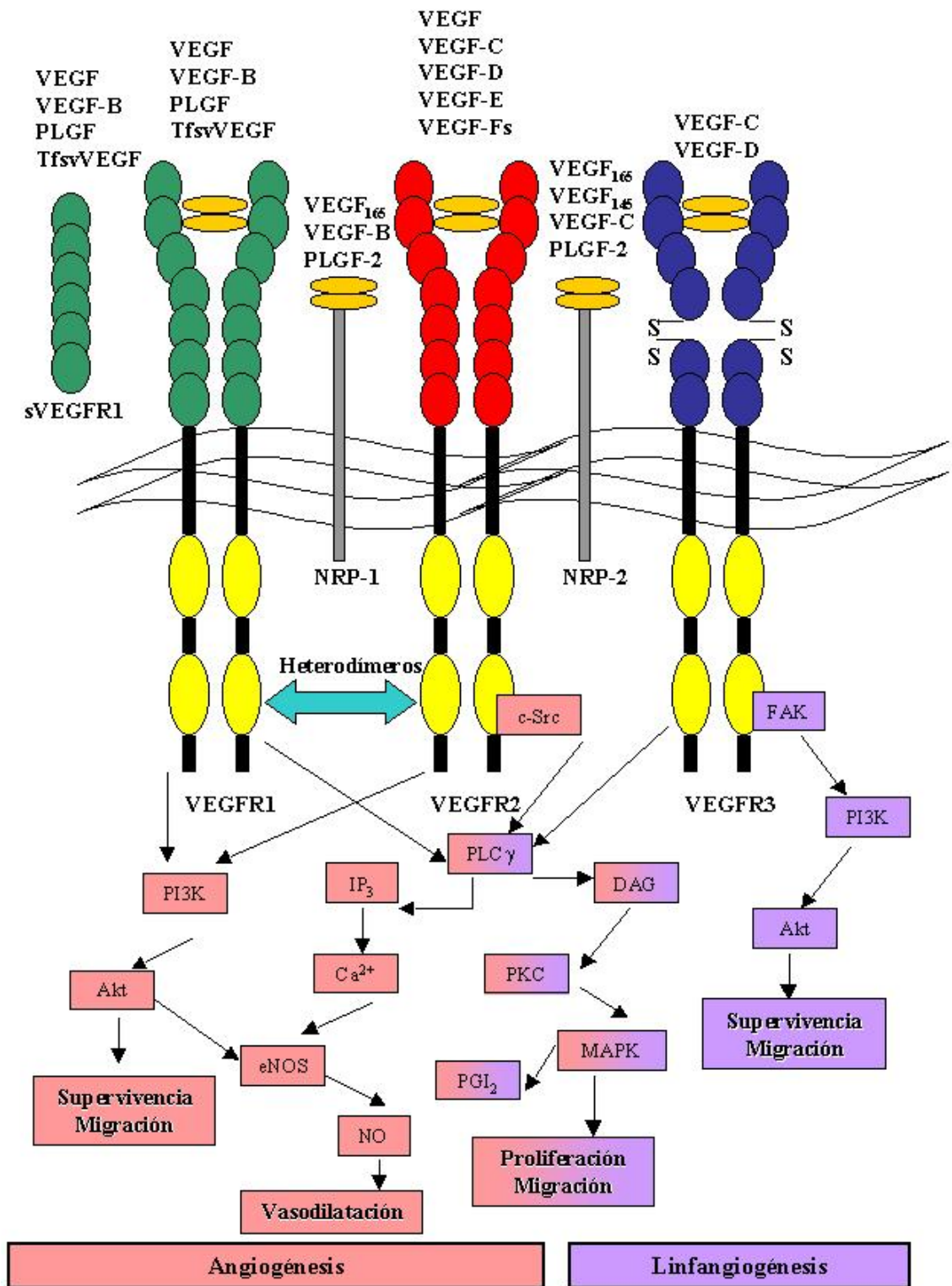
que van a permitir la transducción de señales al interior de la célula. La autofosforilación del residuo Y1169 va a permitir la unión y activación de la fosfolipasa C gamma (PLC $\gamma$ ), regulando la proliferación de las células endoteliales a través de la vía de regulación de las proteínas kinasas activadoras de la mitosis (MAPK)<sup>144,145</sup> (figura 8).

Otros estudios sugieren que el patrón de autofosforilación de VEGFR1 puede variar según interaccione con VEGF o PLGF. Esto haría que VEGFR1 pudiera adoptar distintas conformaciones en su dominio intracelular o distintos modos de interactuar con moléculas asociadas, como son los proteoglicanos heparan-sulfato y las neuropilinas, que podrían afectar a la disposición de los residuos tirosina como sustratos de la kinasa<sup>143</sup>. Por otro lado, la interacción de VEGFR1 con VEGFR2 formando heterodímeros, desencadena señales más intensas que los homodímeros formados por VEGFR1 y VEGFR2, y parecen ser responsables de la hiperpermeabilidad vascular<sup>128,136,143</sup>.

#### 1.6.6.2 Vía VEGFR2/Flk-1

VEGFR2 contiene también multitud de residuos de tirosina (Y951, Y1054, Y1059, Y1175, Y1214) que pueden autofosforilarse. La fosforilación del residuo Y1175 permite la activación de PKC $\gamma$  estimulando la vía de la PKC, permitiendo la generación de inositol trifosfato y la movilización de calcio. Esta vía, junto con la de PKC $\beta$ , va a estimular la cascada de proteínas c-Raf-MEK-MAP-kinasa, activando la síntesis de DNA. Además, como la mayoría de los receptores con actividad tirosina-kinasa, activa la vía de Ras mediante Shc-Grb2, aunque se ha visto que la formación de Ras-GTP es baja tras la estimulación de VEGFR2. La fosforilación de este residuo se ha visto esencial en la inducción de señales para la diferenciación de los hemangioblastos.

Este residuo también constituye un dominio de unión a Shb, implicado en la activación de PI3-kinasa que va a permitir la supervivencia de la célula<sup>143</sup> (figura 8).



**Figura 8.-** Diagrama de las vías de transducción de señales de los factores de la familia del VEGF. (MAPK, proteína activadora de la mitosis; FAK, kinasa de adhesión focal; PLC, fosfolipasa C; PI3K, kinasa inositoltrifosfato; PKC, proteína kinasa C; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; Akt, kinasa antiapoptótica; DAG, diacylglicerol; eNOS, óxido nítrico sintasa constitutiva endotelial; NO, óxido nítrico; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina).

La fosforilación del residuo Y951 también es importante en la inducción de señales, para la organización de las fibras de actina y la migración de las células endoteliales en respuesta a VEGF, mediante la unión y fosforilación de la proteína adaptadora específica de células T (TSAd), que contiene un dominio con homología a Src (SH2) y otro dominio de unión a proteínas tirosina-kinasa. La fosforilación de los residuos Y1054 e Y1059 también está relacionada con la regulación positiva de la kinasa<sup>143</sup>.

#### 1.6.6.3 Vía VEGFR3/Flt-4

Las vías de transducción de señales a través de VEGFR3 han sido poco estudiadas hasta la fecha. Se conocen cinco residuos de tirosina con capacidad para autofosforilarse (Y1230, Y1231, Y1265, Y1337, Y1363) identificadas en el extremo C-terminal. El residuo Y1337 es capaz de unirse a Shc y GRB2 iniciando la vía de las MAP-kinasa<sup>143</sup>. Recientemente se ha demostrado que VEGFR3 contiene un dominio de unión a la kinasa de adhesión focal (FAK), cuya activación impide la entrada en apoptosis de la célula<sup>146</sup> (figura 8).

### **1.6.7 Implicaciones clínicas del análisis de los factores de la familia del VEGF y sus receptores en el cáncer**

El proceso de neoangiogénesis no sólo es esencial para el crecimiento del tumor<sup>48</sup>, sino que además, acompaña a la malignización tumoral desde las primeras etapas del desarrollo del tumor<sup>60</sup> hasta los últimos estadios de metastatización a distancia<sup>147</sup>. Esto ha supuesto que en la última década haya crecido el interés por el estudio de las aplicaciones clínicas de la neoangiogénesis, especialmente de los factores y receptores de la familia del VEGF, en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer<sup>148</sup>.

#### 1.6.7.1 Implicaciones pronósticas

El estudio de la expresión de VEGF por las células tumorales, mediante distintas técnicas como la inmunohistoquímica, el western-blot, la reacción en cadena de la

polimerasa y la hibridación *in situ* en distintos tipos de tumores, ha mostrado una alta asociación entre el aumento de la expresión de este factor y los estadios tumorales más avanzados, junto a una menor supervivencia. En muchos tumores y, con muy pocas excepciones<sup>149,150</sup>, VEGF se ha mostrado como un factor pronóstico significativo de recurrencias y/o supervivencia, respecto a otros factores pronósticos clínico-patológicos convencionales<sup>151-165</sup>. Otras proteínas como VEGF-C y VEGF-D, también se han mostrado como factores pronósticos en los estudios realizados hasta el momento<sup>166-180</sup>.

Respecto al cáncer de pulmón, los primeros artículos relacionados con la expresión de VEGF y el pronóstico de la enfermedad, mostraron que pacientes con tumores del tipo no microcítico que presentaban la expresión de VEGF tenían un peor pronóstico que aquellos que no la expresaban<sup>181-183</sup>. Posteriormente, numerosos estudios han correlacionado la expresión de VEGF con la progresión de la enfermedad y la disminución de la supervivencia<sup>184-207</sup>. Sin embargo, al igual que en otros tumores, algunos estudios no han encontrado ninguna asociación entre la expresión de VEGF y la supervivencia<sup>208-214</sup>. Un meta-análisis realizado por Delmotte y cols.<sup>215</sup> sobre 20 estudios publicados con anterioridad al año 2002, mostró que 15 de ellos relacionaban la expresión de VEGF con la disminución de la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón, revelando que la expresión de VEGF es un factor pronóstico desfavorable en pacientes con tumores del tipo no microcítico. Otro factor de la familia del VEGF que se ha visto relacionado con la disminución de la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón ha sido el VEGF-C<sup>205,216-219</sup>.

El análisis de los receptores de la familia del VEGF no ha mostrado resultados concluyentes respecto a su implicación en la supervivencia de los pacientes con cáncer, excepto para VEGFR3/Flt-4, donde se ha relacionado su expresión con la disminución de la supervivencia, tanto en pacientes con cáncer de pulmón<sup>217,219,220</sup> como de otros tumores<sup>167,178,179</sup>. Sin embargo, mientras algunos estudios realizados para VEGFR1/Flt-1 y VEGFR2/Flk-1 muestran relación entre la expresión de estos receptores y una disminución de la supervivencia<sup>149,207</sup>, otros no muestran ninguna relación<sup>150,182,221-223</sup> e incluso en el estudio realizado por Zhukova y cols.<sup>224</sup> la expresión de VEGFR1 se relaciona con una mayor supervivencia.

La evaluación de la expresión del VEGF por el tumor en todos los casos anteriores depende de la disponibilidad de tejido obtenido mediante técnicas más o menos invasivas como la resección quirúrgica o las técnicas broncoscópicas. Sin embargo, la mayoría de los factores angiogénicos, como el VEGF, son solubles y con capacidad para difundir al ser secretado por los tumores, pudiéndose reflejar la actividad angiogénica del tumor en fluidos biológicos, como el suero, plasma, líquido pleural, etc. Esto teóricamente ofrece una mayor ventaja al utilizarse técnicas no invasivas y ser más fáciles de obtener que las muestras de tejido<sup>64</sup>.

Esto ha aumentado, en los últimos años, el interés en el estudio de los niveles circulantes de VEGF en pacientes con cáncer, como posible indicador pronóstico de la enfermedad. Los estudios realizados en pacientes con tumores de distinta localización, han demostrado una clara relación entre el aumento de los niveles de VEGF en suero con la progresión en el estadio tumoral y la disminución de la supervivencia<sup>64</sup>, con muy pocas excepciones, posiblemente debidas a diferencias metodológicas<sup>225,226</sup>.

Los estudios realizados hasta la fecha, en pacientes con cáncer de pulmón, han mostrado una clara relación entre el aumento de los niveles de VEGF séricos y la progresión en el estadio y la metástasis a ganglios linfáticos<sup>227-231</sup>, así como una menor supervivencia de los pacientes que presentan niveles altos de VEGF en suero<sup>232-239</sup>, con algunas excepciones<sup>189,240-245</sup>, debidas principalmente a diferencias metodológicas<sup>225,226</sup>. Además, algunos de estos estudios han encontrado diferencias significativas en los niveles séricos de VEGF y la forma soluble de VEGFR1 entre sujetos sanos y pacientes con cáncer de pulmón, que muestran niveles más elevados en estos últimos<sup>236,239,244-246</sup>, lo que ha llevado a pensar en su posible utilización en el diagnóstico precoz de pacientes con cáncer de pulmón. Otro factor que se ha encontrado elevado en el suero de pacientes con cáncer de pulmón es el VEGF-C, que se ha relacionado con una mayor tendencia a la metástasis ganglionar<sup>230,231,247</sup>.

Niveles elevados de VEGF también se han encontrado en el derrame pleural de pacientes con cáncer de pulmón, indicador de un peor pronóstico<sup>248</sup>, que se han correlacionado con la cantidad de volumen acumulado y la diseminación de células tumorales a la pleura<sup>249</sup>.

### 1.6.7.2 Implicaciones en la predicción de la respuesta al tratamiento

Los estudios realizados en pacientes con cáncer han demostrado una disminución de los niveles de VEGF sérico tras la resección del tumor primario, excepto para aquellos pacientes con recurrencias, donde se han observado niveles altos de VEGF persistentes, pre y post-cirugía, o un aumento de los niveles tras una caída inicial después de la cirugía<sup>64</sup>. Este incremento en los niveles de VEGF post-cirugía permite el crecimiento rápido de micrometástasis silentes en el período post-quirúrgico<sup>250</sup>. Además, existe una mayor probabilidad de recurrencia tras la cirugía en pacientes con altos niveles de VEGF en el tejido<sup>196,251,252</sup> y cambio en el patrón de expresión de sus distintas isoformas<sup>197</sup>.

Actualmente, no existen indicadores estandarizados para la predicción de respuesta a quimioterapia. Sin embargo, en diversos estudios realizados en distintos tipos de tumores, entre los que se encuentra el cáncer de pulmón, se ha podido observar que aquellos pacientes con niveles altos de VEGF sérico antes de iniciar el tratamiento quimioterápico responden peor a éste, y que aquellos pacientes que han iniciado el tratamiento y muestran una disminución de los niveles de VEGF sérico tienen una mejor respuesta al tratamiento quimioterápico que aquellos que mantienen niveles elevados<sup>64,237,244,245,253,254</sup>. Estos datos indican un posible papel predictivo de los niveles de VEGF en suero respecto a la respuesta del tumor al tratamiento<sup>64</sup>.

### 1.6.7.3 Implicaciones en el tratamiento del cáncer

Durante los últimos años, diversos estudios han demostrado *in vitro* y/o *in vivo* que la administración de ciertos agentes quimioterápicos, a dosis menores de la dosis máxima tolerada durante largos períodos de tiempo, se acompaña de actividad anti-angiogénica, obteniéndose una mejoría en la respuesta y previniendo la resistencia al tratamiento, respecto a las dosis y pautas de administración convencional. Este incremento de la actividad anti-angiogénica va a permitir la estabilidad del endotelio vascular circundante al tumor, mediante un aumento de los niveles de diversos factores anti-angiogénicos y la disminución de los niveles de factores pro-angiogénicos como el VEGF<sup>255,256</sup>.

Sin embargo, el incremento del conocimiento de la biología molecular del cáncer, ha permitido durante los últimos años desarrollar nuevas terapias biológicas frente a los distintos aspectos del desarrollo tumoral, como los fármacos que interfieren en la angiogénesis tumoral. Entre ellos, destacan los anticuerpos frente a VEGF y sus receptores (tabla 4), siendo el bevacizumab (Avastin<sup>TM</sup>, Genetech) el primer anticuerpo monoclonal anti-VEGF aprobado para el tratamiento en primera línea del cáncer, que ha demostrado una mayor probabilidad de supervivencia en pacientes con enfermedad avanzada<sup>81,256</sup>. Este es el primer fármaco, desde hace más de diez años, que muestra un aumento significativo de la probabilidad de supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón, en combinación con paclitaxel y carboplatino, respecto a paclitaxel y carboplatino sin bevacizumab (12,5 meses, respecto a 10,2 meses;  $p=0,007$ )<sup>72</sup>. El mecanismo de acción del bevacizumab no está completamente estudiado, pero parece que produce un desequilibrio en la regulación de la neoangiogénesis, favoreciendo la anti-neoangiogénesis en el medio circundante al tumor reduciendo la permeabilidad vascular. Esta disminución de la permeabilidad vascular va a preceder a la caída de la presión intersticial que va a permitir una mejor distribución de los agentes quimioterápicos al tumor<sup>256</sup>. Además, se conoce que el bevacizumab se mantiene circulante con niveles elevados de dos a tres semanas, lo que parece inhibir la repoblación tumoral y la movilización de distintas estirpes celulares con capacidad angiogénica desde la médula ósea, durante las pausas del tratamiento quimioterápico y sin los efectos mielosupresores de la quimioterapia<sup>257</sup>.

## 1.7 Los estudios de *microarrays*

El descubrimiento de las endonucleasas de restricción<sup>258-260</sup>, las transcriptasas inversas<sup>261,262</sup>, la introducción del *Southern*<sup>263</sup>, *Northern*<sup>264</sup>, el *dot blotting*<sup>265</sup> y los métodos de secuenciación del DNA<sup>266,267</sup>, han promovido el desarrollo de distintas técnicas diagnósticas desde los años 70. Sin embargo, fue el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por los grupos de Saiki<sup>268</sup> y Mullis<sup>269</sup>, a mediados de los años ochenta, lo que verdaderamente revolucionó la biología y el diagnóstico molecular.

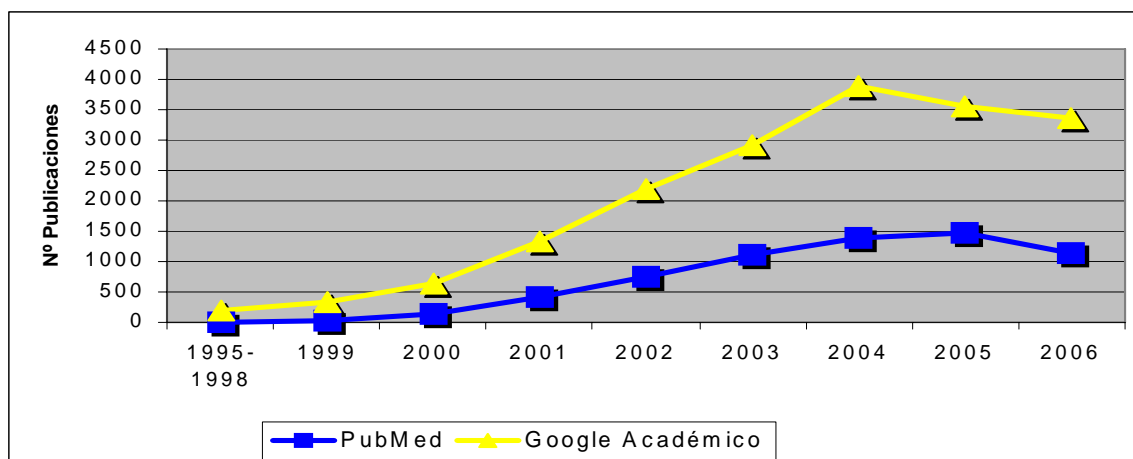
Por otro lado, los avances en la química, bioquímica y la biología de los ácidos nucleicos y el desarrollo biotecnológico, permitieron a principios de siglo, secuenciar el genoma completo de distintos organismos, entre ellos el genoma humano<sup>270-272</sup>. La información obtenida y la tecnología desarrollada han impulsado el desarrollo de nuevos métodos para mejorar el diagnóstico mediante el análisis de ácidos nucleicos.

A comienzos de los años noventa, la compañía biotecnológica Affymetrix presentaba una nueva tecnología basada en semiconductores y fotolitografía capaz de construir *chips* de nucleótidos con aplicaciones biológicas<sup>273</sup>. Los *chips* de Affymetrix, también conocidos como *microarrays* de alta densidad de oligonucleótidos, eran de un tamaño muy pequeño y contenían en su interior cientos de miles de oligonucleótidos de cadena sencilla. Estos oligos eran sintetizados *in situ* con la secuencia de bases deseada y permitían el análisis de expresión de decenas de miles de genes a la vez. Poco tiempo después, el grupo de Patrick O. Brown, de la Universidad de Stanford, publicaba un trabajo en el que se mostraba el desarrollo de otra tecnología de *microarrays* alternativa a la patente de Affymetrix. En este caso, se depositaban de forma robotizada pequeñas cantidades de diferentes cDNAs monocatenarios sobre un soporte sólido de vidrio del tamaño de un portaobjetos y, a continuación, se hibridaban sobre éste las muestras de interés que, previamente, habían sido marcadas con fluorocromos no isotópicos<sup>274</sup>. Estos chips recibieron el nombre de *microarrays* de cDNA.

Aunque estas tecnologías de *microarrays* estaban aún en proceso de estandarización y perfeccionamiento, el impacto que supusieron en la investigación biomédica fue comparable al desarrollo de las técnicas de secuenciación del DNA y el descubrimiento de la PCR, puesto que, por primera vez permitían estudiar el grado de expresión de decenas de miles de genes de forma simultánea, en un formato miniaturizado. Esto ha provocado una minirevolución en el mundo de la ciencia y la medicina<sup>275</sup>, que ha provocado el aumento de las publicaciones relacionadas con los *microarrays*, de manera casi exponencial, en la última década<sup>276</sup>. En el año 2002, ya una publicación recogía nueve plataformas desarrolladas y comercializadas por distintas empresas, además de la de Affymetrix, para el análisis de la expresión génica mediante *microarrays*<sup>277</sup>.



Esta tecnología ha impactado especialmente en el campo de la oncología, por cuanto permite estudiar el patrón de expresión génica (transcriptoma) de las células o tejidos tumorales y compararlo con otras células o tejidos no tumorales. Esto ha llevado a la aplicación con gran asiduidad de las técnicas de *microarrays* en el estudio del cáncer y el consecuente aumento del número de publicaciones, desde finales de la década pasada (figura 9).



**Figura 9.-** Número de publicaciones por año con las palabras clave: “cDNA microarrays” & “Cancer”. La búsqueda se realizó mediante PubMed ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)) y Google Académico ([www.google.es](http://www.google.es)).

Hasta la actualidad, los trabajos se han centrado principalmente, en la búsqueda de marcadores tumorales de detección temprana<sup>278-283</sup>, en la subclasificación y caracterización molecular de los diferentes subtipos de tumores<sup>284-290</sup> y en la identificación de dianas terapéuticas sobre las que dirigir los tratamientos antitumorales<sup>291-294</sup>. Así, los datos arrojados por estos trabajos muestran que existe correlación entre las subclases genotípicas moleculares de los tumores, el pronóstico clínico y la respuesta de éstos frente a los tratamientos terapéuticos actualmente empleados.

### 1.7.1 Los estudios de *microarrays* en el cáncer de pulmón

Los estudios realizados en cáncer de pulmón se centraron en un primer momento en la caracterización y clasificación molecular de los distintos tipos histológicos<sup>295-302</sup>. Estos estudios mostraron diferentes perfiles genéticos para los distintos tipos tumorales. Los tumores del tipo escamoso se caracterizaban por sobreexpresar genes implicados en

la detoxificación de carcinógenos, posiblemente en respuesta a carcinógenos del medio, y en la regulación de citoqueratinas<sup>296,298,299,301</sup>. Los adenocarcinomas, sin embargo, se caracterizaban por una expresión anormal de los genes relacionados con el surfactante pulmonar y los alveolos pulmonares<sup>297-300,302</sup>, lo que indica un posible origen de estos tumores en los neumocitos de tipo II del epitelio alveolar y las células epiteliales de revestimiento de los bronquiolos terminales denominadas células de clara<sup>298</sup>. Mientras, los tumores de células grandes se caracterizaban por un perfil genético de transición entre el fenotipo epitelial y mesenquimal<sup>299</sup>. Finalmente, los tumores de célula pequeña se han visto caracterizados por la sobreexpresión de genes implicados en la proliferación celular y la diferenciación neuroendocrina, como era de esperar<sup>295,297,299,301</sup>.

Los tumores del tipo adenocarcinoma han mostrado ser hasta el momento los más heterogéneos, desde el punto de vista molecular. Los grupos de Garber<sup>299</sup> y Bhattacharjee<sup>297</sup> publicaron, en el año 2001, subclasificaciones del adenocarcinoma de pulmón, basados en sus perfiles genéticos. El estudio realizado por Garber y cols.<sup>299</sup>, estableció tres subgrupos de adenocarcinomas, donde dos de ellos sobreexpresaban genes relacionados con el surfactante pulmonar, mientras el tercero sobreexpresaba genes relacionados con la remodelación tisular, lo que se relacionaba con que muchos de los tumores primarios del tercer grupo fueran metastásicos, y dos muestras de tejido metastásico intrapulmonar fueron clasificados también en el tercer grupo. Estos resultados parecen relacionar el perfil genético del tercer subgrupo con la progresión y/o adquisición del fenotipo metastático que se identificó con un comportamiento más agresivo, respecto a los dos primeros. Por otro lado, el estudio de Bhattacharjee y cols.<sup>297</sup> identificó cuatro subtipos de adenocarcinoma, donde se incluía un subtipo con características genéticas neuroendocrinas, otro con genes sobreexpresados implicados en la división celular y proliferación, un tercero con genes sobreexpresados relacionados con el surfactante pulmonar y un cuarto subtipo con genes sobreexpresados relacionados con neumocitos de tipo II. Estos dos últimos subtipos se correlacionaban con los dos primeros subtipos descritos por Garber y cols.<sup>299</sup>.

Además, estos y otros estudios han correlacionado distintos perfiles genéticos con los diferentes grados de diferenciación, el estadio tumoral y los antecedentes tabáquicos<sup>297,299,301,303-305</sup>. La posibilidad de clasificar molecularmente los pacientes con

cáncer de pulmón, entre fumadores y no fumadores, tiene especial relevancia, al poder reflejar una distinta génesis tumoral, lo que puede estar implicado en distintas respuestas al mismo tratamiento. Esto se ha observado en dos ensayos clínicos, uno realizado con erlotinib (Tarceva<sup>TM</sup>, Genentech/OSI Pharmaceuticals) y otro con gefitinib (Iressa<sup>TM</sup>, AstraZeneca), donde los pacientes no fumadores mostraron una mayor supervivencia que los fumadores<sup>28,306</sup>. Los estudios realizados por Bhattacharjee y cols.<sup>297</sup> mostraron que pacientes con adenocarcinomas de pulmón y un bajo hábito tabáquico se clasificaban en distintos subgrupos moleculares respecto a aquellos que tenían un mayor hábito tabáquico. Por otro lado, los trabajos de Miura<sup>304</sup> y Powell<sup>305</sup> mostraron que los perfiles genéticos entre pacientes con adenocarcinoma de pulmón fumadores y no fumadores eran distintos, además de mostrar patrones moleculares diferentes en la transición del tejido no patológico al tumoral.

Estos y otros estudios también se han basado en el análisis de perfiles moleculares que permitieran por un lado diferenciar la enfermedad tumoral, para el diagnóstico del cáncer de pulmón y, por otro, hacer una predicción pronóstica, para la detección temprana de metástasis, la predicción del tiempo libre de enfermedad o supervivencia y, finalmente, la predicción de la respuesta a terapia<sup>297,299,300,303,307-316</sup>. Muchos estudios han sido capaces de identificar perfiles moleculares que diferencian entre el tejido no tumoral del tumoral<sup>298,300,311,317-319</sup>. Estos estudios incluyen genes implicados en la regulación del ciclo celular, el mantenimiento y degradación de la matriz extracelular y genes estructurales y de motilidad celular<sup>300,311,317</sup>. Sin embargo, pocos estudios se han realizado que relacionen el tratamiento quimioterápico con la respuesta clínica. Esto puede ser debido en parte a la dificultad de hacer una valoración precisa de la respuesta clínica al tratamiento. Ohira y cols.<sup>320</sup> encontraron que pacientes tratados con quimioterapia previa a la resección quirúrgica del tumor y respuesta parcial, mostraban una sobreexpresión de genes relacionados con la angiogénesis, la invasión y la adhesión celular. Los resultados parecen indicar que el tratamiento con antiangiogénicos anterior a la resección quirúrgica podría ser efectivo.

Estos estudios podrían ser la base para el desarrollo de nuevos métodos para el diagnóstico precoz y/o de una nueva clasificación molecular del cáncer de pulmón, que permitiría la toma de decisiones en el tratamiento a administrar basado en la patología

molecular de los tumores. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios con mayores tamaños muestrales para investigar en detalle las relaciones entre los distintos perfiles moleculares con la etiología, patogénesis y el comportamiento clínico y biológico de dichas lesiones.

## **1.8 La investigación en el ámbito hospitalario**

El empleo y desarrollo de tecnologías de genómica diferencial y bioinformática para el estudio de diferentes patologías en el contexto hospitalario, requiere grupos multidisciplinares capaces de ligar los conocimientos generados desde las diferentes disciplinas de la investigación básica (biología, ciencias computacionales, matemáticas, psicología, etc.) con la realidad clínica<sup>321</sup>. A raíz de esta necesidad, nació el concepto de investigación trasnacional, cuyo propósito es tratar de construir un contexto de trabajo común para investigadores clínicos y básicos que permita la interacción entre ambas disciplinas investigadoras, y facilite la aplicación de los nuevos conocimientos y tecnologías disponibles en el ámbito hospitalario<sup>322</sup>. El objetivo final de este tipo de investigación, es beneficiar a los pacientes con diagnósticos y estrategias terapéuticas personalizadas más efectivas, desarrolladas a partir de la investigación llevada a cabo con los propios pacientes<sup>323</sup>.

Potencialmente, la capacidad de las nuevas técnicas de análisis genómico, proteómico y bioinformático para generar información individualizada de los pacientes, parece ser capaz de cumplir con estas perspectivas. Sin embargo, es evidente que la transmisión del conocimiento generado por la ciencia básica a la aplicación clínica es ineficiente y decepcionante<sup>324</sup>. Esto se debe principalmente a que los conocimientos generados en los estudios de laboratorio no son fáciles de adaptar a la investigación clínica, y no se suelen plantear cuestiones científicas desde la práctica clínica, lo que hace que los estudios empiecen y acaben en el ámbito del laboratorio. Además, los escasos recursos destinados a este tipo de investigación, la falta de personal especializado y formado en esta disciplina, la falta y/o la deficiente colaboración entre los investigadores básicos y clínicos, la estructuración de los centros donde se deben llevar a cabo las investigaciones y la ausencia de mecanismos que faciliten la

investigación traslacional por parte de las distintas administraciones implicadas, son otros de los impedimentos para llevar a cabo una investigación traslacional eficiente<sup>325</sup>.

La medicina traslacional es una nueva disciplina que debe integrar aspectos de la investigación básica y clínica y, por lo tanto, requiere de destrezas y recursos no disponibles normalmente en un laboratorio de investigación o en el ámbito clínico. Esto hace que este tipo de investigación no se desarrolle adecuadamente en las universidades o institutos de investigación al carecer éstos de la experiencia clínica, al igual que difícilmente se puede desarrollar en los hospitales que carecen de la experiencia investigadora propia del laboratorio. Por lo tanto, para el desarrollo de la medicina traslacional se hace indispensable el desarrollo de nuevos centros que aúnen ambas destrezas y permitan el desarrollo de estudios, que se inicien en el laboratorio y finalicen en el manejo del paciente sin salir del centro, además de la necesidad de formar personal investigador que desarrolle su actividad investigadora en el campo de la investigación traslacional y que sea intermediario entre la investigación clínica y básica, facilitando la colaboración entre ambas disciplinas<sup>325</sup>.

La investigación traslacional es el mecanismo necesario e imprescindible para que los conocimientos científicos adquiridos en el laboratorio permitan el avance en el manejo clínico de las enfermedades, por lo tanto, este tipo de investigación requiere la formación de grupos multi e interdisciplinarios de investigación con personal especializado que permitan la interacción entre el laboratorio y la clínica.





## **2. OBJETIVOS**





**L**a finalidad de este trabajo de investigación es el estudio de la expresión de fenotipos neoangiogénicos y el estudio a gran escala de los niveles de expresión de genes, mediante la aplicación del análisis de *microarrays* de oligonucleótidos en muestras clínicas de uso diagnóstico en lesiones neoplásicas de pulmón. Para ello se plantean como objetivos concretos:

1.- Analizar el patrón de expresión de los factores VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, y de sus receptores VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3, como marcadores angiogénicos y linfangiogénicos en lesiones malignas de pulmón.

2.- Determinar la utilidad de la detección de los patrones de angiogénesis y linfangiogénesis, en relación al comportamiento biológico y clínico de dichas lesiones.

3.- La aplicación del análisis de *microarrays* de oligonucleótidos para el estudio de la expresión génica diferencial en lesiones malignas de cáncer de pulmón.

4.- Emplear y desarrollar herramientas bioinformáticas de análisis de los datos, imprescindibles en investigación genómica.

5.- Identificación de genes diferencialmente expresados, involucrados en los procesos de invasividad, neoangiogénesis y linfangiogénesis en tumores primarios de pulmón.

6.- Determinar la utilidad de la detección de los patrones génicos de expresión, en relación al comportamiento biológico y clínico de dichas lesiones.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 3.1 Materiales

### 3.1.1 Productos

| <u>Productos</u>  | <u>Casas Comerciales</u> |
|---|--------------------------|
| Acetona   | Dirsa                    |
| Ácido Acético Glaciar                                       | Merck                    |
| Ácido Cítrico   | Merck                    |
| Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA)                       | Sigma                    |
| Agarosa   | Pronadisa                |
| Anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado                  | Vector Laboratories      |
| AP-Red <i>kit</i>   | Zymed Laboratories       |
| Aquatex   | Merck                    |
| Azul de Bromofenol  | Sigma                    |
| Bromuro de Etidio   | Sigma                    |
| BSA acetilada (50 mg/ml)                                    | Invitrogen               |
| Butanol-1   | Prolabo                  |
| Citrato Sódico  | Merck                    |
| Cloroformo  | Merck                    |
| Cloruro Potásico  | Quimipur                 |
| Cloruro Sódico  | Panreac                  |
| Complejo strept ABC-fosfatasa                               | DAKO                     |
| Decon 90  | Merck                    |
| Depex   | BDH Chemicals            |
| Dietilpirocarbonato (DEPC)                                  | Ambion                   |
| DNA de Esperma de Arenque (10mg/ml)                         | Promega                  |
| dNTPs 10mM  | Invitrogen               |
| Ditiotreitol (DTT)  | Invitrogen               |
| E. Coli DNA ligasa  | Invitrogen               |
| E. Coli DNA polimerasa I                                    | Invitrogen               |
| E. Coli RNasa H   | Invitrogen               |
| Enzo Bioarray <i>High Yield RNA Transcript Labeling Kit</i> | Affymetrix               |
| Eosina  | Surgipath                |
| Etanol absoluto   | Panreac                  |
| <i>Firs Strand cDNA Buffer 5x</i>                           | Invitrogen               |
| Fosfato Potásico monobásico                                 | Carlo Erba               |
| Fosfato Sódico  | Merck                    |

|  |   |
|--|---|
| <i>GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit</i> | Affymetrix                                    |
| <i>GeneChip Sample Cleanup Module</i>                | Affymetrix                                    |
| Glicerol   | Sigma   |
| Hematoxilina de Carazzi                              | Panreac                                       |
| Hidróxido sódico                                     | Merck   |
| IgG anti-ratón de conejo                             | DAKO  |
| IgG de Cabra   | Sigma   |
| Inmunoglobulinas anti-conejo de cerdo                | DAKO  |
| Isopropanol  | Panreac                                       |
| <i>IVT Labeling kit</i>                              | Affymetrix                                    |
| MES/MES (Sal de Sodio)                               | Sigma   |
| Oligo B2 Control                                     | Affymetrix                                    |
| Parafina   | Panreac                                       |
| Paraformaldehído                                     | ICN   |
| Quantikine™ <i>Human VEGF Immunoassay</i>            | R&D Systems                                   |
| R-Ficoeritrina-Estreptavidina (SAPE)                 | Molecular Probes                              |
| <i>Rneasy Micro kit</i>                              | Qiagen  |
| <i>Rneasy Mini kit</i>                               | Qiagen  |
| <i>Second Strand Reaction Buffer 5x</i>              | Invitrogen                                    |
| 3-Aminopropil Trietoxysilano                         | Sigma   |
| SSPE 20x   | BioWhittaker Molecular Applications / Cambrex |
| <i>SuperScript II</i>                                | Invitrogen                                    |
| T4 DNA polimerasa                                    | Invitrogen                                    |
| T7-Oligo (dT) <i>Promoter Primer Kit</i>             | Affymetrix                                    |
| Tritón X-100   | Sigma   |
| Trizma base  | Sigma   |
| <i>TRIzol Reagent</i>                                | Invitrogen                                    |
| Tween-20 10%   | Pierce Chemical                               |
| Xilano Cianol  | Sigma   |
| Xilol  | Panreac                                       |

### **3.1.2 Población y muestras**

#### 3.1.2.1 Población a estudiar

**S**e estudiaron 80 pacientes asistidos por sospecha clínica y/o radiológica de cáncer de pulmón, además de pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico por cáncer de pulmón. Los criterios específicos para la inclusión de pacientes en el estudio fueron:

- 1) Pacientes asistidos por tumores broncogénicos primarios.
- 2) Pacientes que no hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia previa a la obtención de las muestras a analizar.

La inclusión de pacientes fue llevada a cabo en los Servicios de Neumología y Cirugía Torácica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, la Unidad de Carcinoma Broncogénico de la Sección de Neumología del Hospital Universitario de Guadalajara, y por el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario de la Princesa de Madrid. Se obtuvo previamente el consentimiento informado del paciente en todos los casos.

Clínicamente, los pacientes incluidos en el estudio fueron clasificados según la estirpe histológica y el estadio de la enfermedad. La clasificación histológica se realizó por los anatomopatólogos en los Servicios de Anatomía Patológica de los centros en los que se obtuvieron las muestras, de acuerdo, con los criterios de la OMS<sup>19</sup>. El estadio de la enfermedad se realizó según una combinación de criterios radiológicos, patológicos y quirúrgicos, de acuerdo con el sistema TNM para la clasificación del cáncer de pulmón, recomendado por el Comité Americano para el Cáncer<sup>20</sup>.

El anexo I incluye las muestras analizadas, la estirpe histológica y el estadio de la enfermedad para cada caso.



### 3.1.2.2 Muestras a estudiar

#### 3.1.2.2.1 *Muestras de tejido pulmonar*

Se analizaron las muestras de tejido tumoral incluido en parafina de todos los casos a estudio, tras realizarse el diagnóstico anatomopatológico. Se obtuvieron, en los casos en los que fue posible, tres muestras distintas de tejido pulmonar, mediante técnicas broncoscópicas y resección quirúrgica, en un entorno estéril y procurando que el período de tiempo en el que la muestra se encuentra a temperatura ambiente fuera el mínimo posible. El estudio posterior se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas y *microarrays* de oligonucleótidos.

- Tipos de tejido obtenido:

- A) Tejido sano. Tejido obtenido a una distancia igual o superior a dos centímetros del límite de la extensión tumoral.
  
- B) Tejido tumoral. Tejido obtenido en la masa tumoral.
  
- C) Tejido peritumoral. Tejido benigno periférico obtenido inmediatamente a continuación del límite de la extensión tumoral.

El límite de la extensión tumoral se delimitó a criterio del cirujano torácico y el neumólogo, implicados en la obtención de las muestras a estudiar, mediante la observación directa del tumor.

El tejido sano y el tejido peritumoral se obtuvieron de pacientes sometidos a resección quirúrgica. Se obtuvo una pieza de cada tejido e inmediatamente se seccionó en dos, una de ellas se fijó en paraformaldehído al 4%, para su inclusión en parafina y posterior estudio histopatológico (tinción con hematoxilina-eosina) e inmunohistoquímico. La otra pieza de tejido se congeló directamente en nitrógeno líquido (-196°C) para la posterior extracción de RNA.

El tejido tumoral se obtuvo tanto de pacientes sometidos a resección quirúrgica como a broncoscopia con biopsia bronquial. Se obtuvo una pieza de los pacientes sometidos a resección quirúrgica que inmediatamente se seccionó en dos, una de ellas se fijó en paraformaldehído al 4%, para su inclusión en parafina y posterior estudio histopatológico (tinción con hematoxilina-eosina) e inmunohistoquímico y, la otra se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido (-196°C) para la posterior extracción de RNA. El resto del tejido resecado se utilizó para su análisis por diagnóstico convencional por parte del Servicio de Anatomía Patológica.

Las muestras de tejido tumoral obtenidas de pacientes sometidos a broncoscopia, se obtuvieron mediante biopsia bronquial. Se tomaron cuatro fragmentos de tejido tumoral por cada paciente, uno de ellos se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido (-196°C) para la posterior extracción de RNA, mientras los otros tres se fijaron en paraformaldehído al 4%, para su inclusión en parafina y su posterior análisis mediante diagnóstico convencional por parte del Servicio de Anatomía Patológica y su estudio mediante inmunohistoquímica.

#### 3.1.2.2.2 *Sangre y suero*

Inmediatamente antes de la intervención quirúrgica o la realización de las técnicas broncoscópicas, se recogió sangre periférica de 54 pacientes con cáncer de pulmón, en tubos de 5 ml sin anticoagulante y por venopunción estándar. El suero se separó mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. A continuación, el suero obtenido y el sedimento celular se aislaron, conservando el suero a -20°C hasta que posteriormente fuera requerido para la técnica de ELISA. Todas las muestras se procesaron y congelaron sin que transcurriera más de 1 hora desde su obtención. Además, se incluyeron como controles en el estudio sueros de 8 voluntarios sanos.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Técnicas Inmunohistoquímicas

#### 3.2.1.1 Soluciones y reactivos empleados

- **Tampón fosfato salino (PBS), 150 mM:**

|                              |               |
|------------------------------|---------------|
| Cloruro potásico             | 0,2 g         |
| Fosfato potásico monobásico  | 0,2 g         |
| Fosfato sódico               | 2,16 g        |
| Cloruro sódico               | 8 g           |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | hasta 1 litro |

El pH se ajustó a 7,4 con HCL

- **Paraformaldehído 4% en PBS (para 200 ml):**

- Preparación de solución de paraformaldehído al 8%. Esta solución se puede almacenar a -20°C hasta su uso.

- 1) Se calientan 50 ml de agua bidestilada a 60°C
- 2) Se añaden 8 g de Paraformaldehído
- 3) Se añade hidróxido sódico hasta la completa disolución del paraformaldehído que se transparente. Se ajusta el pH a 7,4 con HCL y se añade H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 100 ml

- Preparación de solución de paraformaldehído al 4% (solución de uso)

- 4) Se diluyen 50 ml de paraformaldehído al 8% en 50 ml de PBS 2x
- 5) Se filtra con filtro de 0,22 µm

- **Tampón tris salino (TBS), 20x (0.5 M):**

|                              |               |
|------------------------------|---------------|
| Trizma base                  | 121,1 g       |
| Cloruro sódico               | 175,3 g       |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | hasta 1 litro |

El pH se ajusta a 7,4 con HCL. Para su empleo, se diluye a 1x con agua bidestilada

- **Tampón Citrato 10 mM:**

|                              |                |
|------------------------------|----------------|
| Ácido Cítrico 0,1 M          | 36 ml          |
| Citrato Sódico 0,1 M         | 164 ml         |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | hasta 2 litros |

\* **Ácido Cítrico 0,1M** \_\_\_\_\_ 1,01 g/l en H<sub>2</sub>O bidestilada

\* **Citrato Sódico 0,1M** \_\_\_\_\_ 29,4 g/l en H<sub>2</sub>O bidestilada

- **Tampón Ácido Etilendiaminetetracético (EDTA) 1 mM:**

|                                |                |
|--------------------------------|----------------|
| EDTA                           | 0,74 g         |
| Hidróxido sódico               | 2 g            |
| H <sub>2</sub> O bidestilada   | hasta 2 litros |
| El pH se ajusta a 8,3 con NaOH |                |

3.2.1.2 Procesamiento de las muestras

Se estudiaron 59 muestras de tejido tumoral obtenido mediante biopsia bronquial y quirúrgica. Además, se estudiaron 10 muestras de tejido peritumoral y de tejido distal, obtenidos mediante resección quirúrgica.

La manipulación de las muestras obtenidas se realizó en un entorno aséptico y con material estéril, procurando que el período de tiempo en el que la muestra se encuentra a temperatura ambiente, sin fijar, fuera el mínimo posible. Las muestras se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4% en PBS, en el mismo quirófano o en la unidad de broncoscopias, y se guardaron 24 horas a 4°C para asegurar una buena fijación. Posteriormente, se lavaron en PBS hasta la eliminación de los restos de fijador y se procedió a la inclusión de las piezas en parafina.

3.2.1.3 Inclusión de muestras en parafina

La inclusión en parafina se realizó mediante la deshidratación previa de las muestras y su posterior inmersión en butanol como solvente intermediario. La deshidratación se llevó a cabo mediante lavados con concentraciones crecientes de etanol de 30 minutos cada uno, hasta llegar al etanol absoluto (2 lavados de 1 hora cada uno). Posteriormente, se lavaron con butanol durante 1 hora y se mantuvieron entre 24h y 72h en butanol, según el tamaño de la pieza, cambiando con frecuencia la solución durante este período de tiempo. Posteriormente, las piezas se sumergieron en tres baños consecutivos de parafina a 60°C, de 1 hora, 12 horas y 3 horas respectivamente.

Los bloques se realizaron con parafina limpia a 60°C depositada en moldes metálicos, donde las piezas se orientaron convenientemente. La inclusión definitiva se

realizó con ayuda de *cassettes*, dejando que la parafina se solidificara a temperatura ambiente y en placa fría, para posteriormente terminar de solidificar en nevera a 4°C.

Una vez incluidas las muestras, se obtuvieron secciones de 5 micras empleando un microtomo (Microm), que se montaron en portaobjetos silanados para aumentar la adherencia de las muestras y evitar que se desprendieran durante su manipulación. El silanado de los portaobjetos se realizó mediante inmersión con 3-aminopropil trietoxysilano al 3% en acetona (2 minutos), seguido de dos lavados con acetona de 1 minuto cada uno y, dos lavados en agua destilada de 1 minuto cada uno, dejando secar los portaobjetos tratados a 60°C.

La primera de las secciones obtenidas fue teñida con hematoxilina y eosina, para el análisis anatomopatológico. Las restantes secciones fueron guardadas a temperatura ambiente, para el estudio inmunohistoquímico posterior.

#### 3.2.1.4 Tinción con hematoxilina-eosina

Se procedió al desparafinado de las secciones utilizando xilol (2 cambios de 10 minutos cada uno) y, se rehidrataron empleando concentraciones decrecientes de etanol durante 10 minutos cada uno, desde el etanol absoluto hasta el etanol al 70%, para acabar con un lavado de agua destilada durante 10 minutos. Tras desparafinar y rehidratar las secciones se procedió a su tinción con hematoxilina de Carazzi durante 5 minutos y se lavaron en agua corriente durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó la tinción con eosina durante 1 minuto, se lavaron las secciones brevemente con agua corriente y se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de etanol de 10 minutos cada lavado, hasta etanol absoluto y, dos lavados con xilol durante 10 minutos cada uno. Una vez realizada la deshidratación, se procedió a montar las secciones con cubreobjetos utilizando Depex.

Los resultados que se obtienen son: núcleos color violeta, colágeno y conectivo aparecen teñidos de color rosa.

## 3.2.1.5 Inmunohistoquímica para la familia del factor VEGF y sus receptores

La determinación inmunohistoquímica de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y sus receptores (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3) se realizó mediante el desparafinado y la rehidratación de las secciones, que posteriormente se sometieron a altas temperaturas y a presión para conseguir el desenmascaramiento de los antígenos de interés. Este desenmascaramiento se realizó con la incubación de las secciones en tampón citrato 10mM o en tampón EDTA 1mM, según el antígeno a detectar (tabla 5), en olla express a presión máxima durante 1 minuto. Después de realizar dos lavados rápidos con agua destilada y dos lavados de 5 minutos cada uno con TBS, se incubaron las secciones en solución de bloqueo, compuesto por suero de burro al 3% en TBS con 0.05% de tritón X-100, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes (tabla 5).

| Anticuerpo Primario | Tipo de anticuerpo   | Casa Comercial           | Dilución | Tampón de recuperación |
|---------------------|----------------------|--------------------------|----------|------------------------|
| <b>VEGF-A</b>       | Monoclonal de ratón  | Santa Cruz Biotechnology | 1:100    | EDTA                   |
| <b>VEGF-B</b>       | Policlonal de conejo | Santa Cruz Biotechnology | 1:100    | Citrato                |
| <b>VEGF-C</b>       | Policlonal de conejo | Zymed Laboratories       | 1:150    | Citrato                |
| <b>VEGF-D</b>       | Monoclonal de ratón  | R&D Systems              | 1:400    | Citrato                |
| <b>VEGFR1</b>       | Policlonal de conejo | Neomarkers               | 1:200    | EDTA                   |
| <b>VEGFR2</b>       | Monoclonal de ratón  | Santa Cruz Biotechnology | 1:50     | Citrato                |
| <b>VEGFR3</b>       | Policlonal de conejo | Santa Cruz Biotechnology | 1:150    | Citrato                |

**Tabla 5.-** Anticuerpos primarios utilizados, casa comercial, dilución usada (en TBS con 10% de solución de bloqueo) y tampón de recuperación, para cada uno de ellos.

La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 24 horas a temperatura ambiente, excepto para VEGF D que se realizó a 4°C, y pasado ese tiempo a 37°C durante 1 hora.

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario se realizaron dos lavados con TBS de 10 minutos cada uno, y se incubaron las secciones con anticuerpos secundarios biotinilados a una dilución 1:500 en TBS con 10% de solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios monoclonales se incubaron con IgG anti-ratón obtenido en conejo (DAKO) y, en el caso de los

anticuerpos primarios policlonales, se incubó con inmunoglobulinas anti-conejo de cerdo (DAKO). Posteriormente se realizaron dos lavados con TBS durante 10 minutos cada uno y se incubaron las secciones con estreptavidina-fosfatasa alcalina (complejo strept ABC-fosfatasa, DAKO), durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras dos lavados con TBS (10 minutos cada uno), la actividad fosfatasa alcalina se reveló utilizando el *kit* AP-Red, que origina un precipitado rojo intenso en el lugar de la inmunoreacción.

Una vez revelado, los núcleos celulares se tiñeron con hematoxilina durante 1 minuto, se lavaron en agua corriente y en agua destilada y se montaron las secciones con cubreobjetos utilizando un medio de montaje acuoso (Aquatex<sup>TM</sup>, Merck).

### 3.2.1.6 Evaluación de la expresión proteica

La evaluación de la expresión proteica se realizó mediante un sistema de gradación subjetiva, desde la intensidad nula de marcaje de la proteína (-), hasta la intensidad máxima (+++). Esta evaluación fue realizada por dos observadores independientes.

Posteriormente, los grados de intensidad obtenidos fueron agrupados en distintos niveles de expresión, para su posterior análisis e interpretación, como se puede observar en la [tabla 6](#). Se consideró expresión positiva aquellas muestras cuyo nivel en la expresión proteica fue de 1 a 3, y muestras con expresión proteica negativa aquellas cuyo nivel en la expresión proteica fue 0.

| Nivel de Expresión | Valor numérico asignado | Grados de intensidad del marcaje |
|--------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Nula               | 0                       | -                                |
| Baja               | 1                       | -/+, +                           |
| Moderada           | 2                       | +/++, ++                         |
| Alta               | 3                       | ++/+++, +++                      |

**Tabla 6.-** Agrupación en niveles de expresión de los grados de intensidad del marcaje proteico.

### 3.2.1.7 Análisis Estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante la obtención de medias y frecuencias, mientras que para el estudio de significación estadística se aplicó el contraste chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), el estadístico de Fisher, la t-Student y el análisis de la varianza (ANOVA). En los casos en los que al realizar la prueba ANOVA se rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias, se prosiguió el análisis con la realización de contrastes *a posteriori* (*Post hoc*).

El estadístico de Fisher se aplicó en aquellos casos en que al aplicar la prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) una de las celdas tuvo una frecuencia menor de cinco. La aplicación de la prueba t-Student y la ANOVA se realizó tras comprobar la normalidad de los datos, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la realización de los histogramas, para cada una de los grupos a comparar. La homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad), para la aplicación de la ANOVA, se comprobó mediante la prueba de Levene. En los casos en los que los supuestos de normalidad u homocedasticidad requeridos para la realización de la t-Student o del ANOVA fueron rechazados, se realizaron las pruebas de la U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis. El nivel de significación que se aplicó en todos los casos fue menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

El análisis de la supervivencia se realizó mediante la obtención de las tablas y curvas de supervivencia con el método de Kaplan-Meier. La supervivencia fue definida como el tiempo desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del fallecimiento del paciente. Los pacientes que al cabo de dos años, desde la fecha del diagnóstico, continuaban con vida o no se pudo obtener su fecha de fallecimiento, fueron censurados para el estudio. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el método log-rank (Mantel-Cox). El nivel de significación que se aplicó fue menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

El programa SPSS 13.0. fue empleado para el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante técnicas inmunohistoquímicas.



### 3.2.2 Técnicas Inmunoenzimáticas (ELISA)

#### 3.2.2.1 Soluciones y reactivos empleados

##### - Preparación VEGF Estándar

Se reconstituye el VEGF estándar (R&D Systems) con 1ml del calibrador RD6U diluido (R&D Systems), para obtener una solución con una concentración final de 2000 pg/ml. La solución obtenida se mantiene 15 minutos con agitación lenta hasta la preparación de las diluciones

##### - Preparación de las diluciones.

Se realizaron diluciones seriadas con la solución del VEGF estándar reconstituida previamente y 500 µl del calibrador RD6U diluido (R&D Systems) en cada tubo (figura 10)

##### - Tampón de lavado (500 ml):

Concentrado del tampón de lavado\_(R&D Systems)\_\_\_\_\_20 ml  
Agua destilada\_\_\_\_\_480 ml

##### - Solución sustrato:

Reactivo A (R&D Systems)\_\_\_\_\_12,5 ml  
Reactivo B (R&D Systems)\_\_\_\_\_12,5 ml  
Se mezclan durante 15 minutos a oscuras

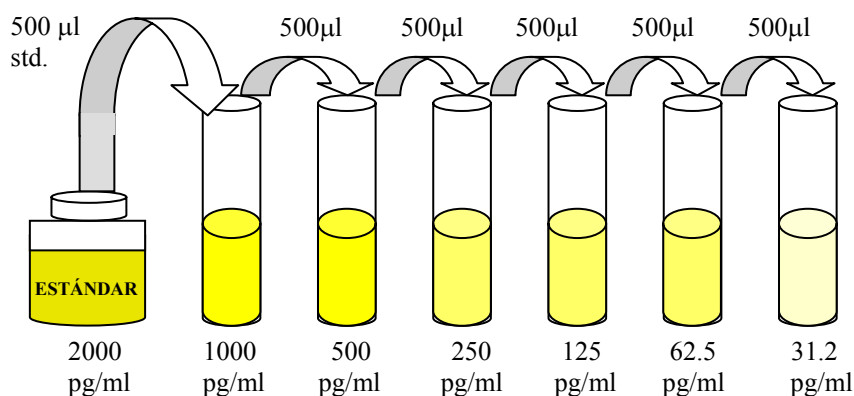


Figura 10.- Preparación de las diluciones a partir del estándar (R&D Systems).

### 3.2.2.2 Procesamiento de las muestras

Se recogió suero de 54 de pacientes con cáncer de pulmón y de 8 voluntarios sanos, en tubos de 5 ml sin anticoagulante mediante venopunción estándar, inmediatamente antes de la intervención quirúrgica o la realización de las técnicas broncoscópicas. El suero obtenido mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y separado del sedimento celular de la sangre se conservó a -20°C.

Para la determinación cuantitativa del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A) se empleó el *Quantikine Human VEGF Immunoassay* (R&D Systems) requiriendo 200 µl de suero de cada sujeto estudiado.

### 3.2.2.3 Procedimiento inmunoenzimático para la cuantificación de VEGF-A

La cuantificación del VEGF se realizó por duplicado para cada una de las muestras. Se utilizaron dos microplacas de poliestireno de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal de ratón frente a VEGF-A fijado en el fondo de cada pocillo. Una vez retirada la tira protectora se añadieron 100 µl del diluyente RD1W a cada pocillo y 100 µl del estándar, las diluciones realizadas previamente, los sueros de los pacientes con cáncer de pulmón y los sueros de los sujetos control. Se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.

Tras la incubación, se lavó cada pocillo en tres ocasiones, con 400 µl de un tampón de lavado. Una vez realizados los distintos lavados se añadieron 200 µl de VEGF-A conjugado a cada pocillo y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Tras esta incubación se volvió a proceder al lavado de los pocillos por tres veces con 400 µl de tampón de lavado. Después de la realización de los lavados se añadieron 200 µl de solución substrato y se incubó durante 25 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se añadieron 50 µl de solución de parada de la reacción a cada pocillo.

Una vez añadida la solución de parada de la reacción se determinó la densidad óptica de cada pocillo mediante un lector de placa (Tecan Spectra Fluor) a longitudes de onda de 450nm y 540nm.

#### 3.2.2.4 Cálculo de los resultados

El cálculo de los resultados se realizó mediante la obtención de la media de las lecturas de la densidad óptica de los duplicados a 450nm, para cada estándar, control y muestra problema, restando la corrección mediante la lectura de la densidad óptica a 540nm y el estándar de concentración cero. La resta con la lectura de la densidad óptica a 540nm se realizó para corregir las imperfecciones ópticas de la microplaca.

La recta patrón se calculó mediante la media obtenida para cada estándar con el programa SPSS 13.0, mediante la realización de la regresión lineal de los datos. Tras la obtención de la recta patrón se obtuvo la concentración de VEGF-A para cada control y muestra problema.

#### 3.2.2.5 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante la obtención de medias y frecuencias, mientras que para el estudio de la significancia estadística se aplicó el contraste U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis. El nivel de significación que se aplicó en todos los casos fue menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

El análisis de la supervivencia se realizó mediante la obtención de las tablas y curvas de supervivencia con el método de Kaplan-Meier. La supervivencia fue definida como el tiempo desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del fallecimiento del paciente. Los pacientes que al cabo de dos años, desde la fecha del diagnóstico, continuaban con vida o no se pudo obtener su fecha de fallecimiento, fueron censurados para el estudio. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el método log-rank (Mantel-Cox). El nivel de significación que se aplicó fue menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

El programa SPSS 13.0. fue empleado para el análisis estadístico de los datos obtenidos.

### 3.2.3 Técnicas de *Microarrays*

El análisis de expresión génica fue llevado a cabo con la plataforma *Genechip*® de Affymetrix por presentar altas tasas de reproducibilidad<sup>326</sup>. Además, la necesidad de tener que superar varios controles de calidad en la integridad de las muestras antes de su análisis junto con controles propios del proceso, favorece este hecho y ofrece garantías acerca de la credibilidad de los resultados obtenidos. Por otra parte, el formato de estos *chips* incluye múltiples sondas correspondientes a distintas regiones de los genes que se desean estudiar para determinar los niveles de expresión de éstos. Gracias a este sistema se obtiene un mayor grado de control sobre las hibridaciones cruzadas y los falsos positivos.

Mediante la plataforma *GeneChip*® *Human Genome Focus Array* de Affymetrix, se estudiaron 29 muestras congeladas obtenidas de 11 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón, 10 de las cuales eran de tejido sano, 10 de tejido peritumoral y 9 de tejido tumoral.

#### 3.2.3.1 Soluciones y reactivos empleados

- **Tampón Tris-acetato (TAE) 50x:**

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Trizma base           | 242 g   |
| Ácido acético glacial | 51,1 ml |
| EDTA 0,5M (pH=8)      | 100 ml  |

- **Tampón de carga 10x:**

|                              |             |
|------------------------------|-------------|
| Glicerol                     | 25 ml       |
| Azul de bromofenol           | 0,25 g      |
| Xilano Cianol                | 0,25 g      |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | hasta 50 ml |

- **MES 12x:**

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| MES                          | 70,4 g  |
| MES (Sal de sodio)           | 193,3 g |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | 800 ml  |

Ajustar pH entre 6,5-6,7  
Añadir ddH<sub>2</sub>O hasta 1 litro  
Filtrar con filtro de 0,2 µm

- **Tampón de Hibridación 2x:**

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| 12x MES                      | 8,3 ml  |
| 5 M NaCl                     | 17,7 ml |
| 0,5 M EDTA                   | 4 ml    |
| 10% Tween 20                 | 0,1 ml  |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | 19,9 ml |

Guardar a 4°C y protegido de la luz

- **Solución de lavado A:**

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| 20x SSPE                     | 300 ml |
| 10% Tween-20                 | 1 ml   |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | 699 ml |

Filtrar con filtro de 0,2 µm

- **Solución de lavado B:**

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| 12x MES                      | 83,3 ml  |
| 5 M NaCl                     | 5,2 ml   |
| 10% Tween-20                 | 1 ml     |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | 910,5 ml |

Filtrar con filtro de 0,2 µm  
Guardar a 4°C

- **Solución de tinción 2x:**

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| 12x MES                      | 41,7 ml  |
| 5 M NaCl                     | 92,5 ml  |
| 10% Tween-20                 | 2,5 ml   |
| H <sub>2</sub> O bidestilada | 113,3 ml |

Filtrar con filtro de 0,2µm  
Guardar a 4°C

- **Solución de anticuerpos:**

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| 2x Solución de tinción           | 300 µl   |
| 50 mg/ml BSA acetilada           | 24 µl    |
| 10 mg/ml Ig G de cabra           | 6 µl     |
| 0,5 mg/ml anticuerpo biotinilado | 3,6 µl   |
| H <sub>2</sub> O bidestilada     | 266,4 µl |

- **Solución de tinción estreptavidina/ficoeritrina (SAPE):**

|  |        |
|--|--------|
| 2x Solución de tinción                     | 300 µl |
| 50 mg/ml BSA acetilada                     | 24 µl  |
| 1 mg/ml Estreptavidina Ficoeritrina (SAPE) | 6 µl   |
| H <sub>2</sub> O bidestilada               | 270 µl |

3.2.3.2 Tratamiento previo del material para la extracción del RNA

Todo el material de plástico utilizado para la extracción de RNA fue tratado con agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O) y dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% (v/v) y, posteriormente, autoclavado con el objetivo de evitar la contaminación y degradación de las muestras por RNAsas. Así mismo, el material de vidrio se esterilizó durante 8 horas en estufa a 260°C y todas las superficies de trabajo se limpiaron con Decon 90.

3.2.3.3 RNA

3.2.3.3.1 *Extracción*

Todos los procesos de extracción y manipulación de RNA se realizaron con guantes y en una cabina esterilizada con luz ultravioleta (UVA).

El tejido se pulverizó en mortero en presencia de nitrógeno líquido. La extracción del RNA total a partir del pulverizado se realizó a 4°C empleando el reactivo TRIzol *Reagent* siguiendo las recomendaciones del proveedor. A continuación, se añadieron a las muestras 0,2 volúmenes de cloroformao para favorecer la separación de los ácidos nucleicos de la fracción proteica y se centrifugaron a 12.500 rpm durante 15 minutos a 4°C. El resultado de este proceso es la generación de tres fracciones: dos fases inmiscibles y una interfase. La fase superior es hidrosoluble y contiene el RNA total de la muestra. Esta fase hidrosoluble se aisló del resto de fracciones y se precipitó durante al menos 8 horas en 1 volumen de isopropanol a -20°C y, posteriormente, se centrifugó a 12.500 rpm durante 10 minutos. El sedimento de RNA obtenido se lavó con 1 ml de etanol frío al 75% y se centrifugó a 8.000 rpm. Para asegurar la eliminación de las trazas de isopropanol que quedan tras la precipitación, se procedió a un segundo lavado del RNA precipitado en las mismas condiciones descritas.

#### 3.2.3.3.2 Purificación

El proceso de purificación del RNA total obtenido, permite eliminar los fragmentos de DNA/RNA con un tamaño menor de 200 pares de bases (pb).

La purificación de las muestras de RNA total obtenido se realizó con el RNeasy *Mini* y *Micro kit* de Qiagen, recuperándose cada muestra en un volumen de 30  $\mu$ l (las que se purificaron con el *Mini kit* ) y 10  $\mu$ l (las que se purificaron con el *Micro kit*) de ddH<sub>2</sub>O tratada con DEPC al 0.2% (v/v), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

En una primera etapa, se procede a la activación de las columnas de lavado y eliminación de los fragmentos ya mencionados. El RNA en ddH<sub>2</sub>O tratada con DEPC se resuspende en la solución RTL/ 1%  $\beta$ -mercaptoetanol/ 250  $\mu$ l de etanol 100%. La mezcla resultante se coloca en una columna de lavado y se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 segundos. En la segunda etapa se realiza el lavado de las columnas, con el objetivo de limpiar la muestra adherida a la columna y arrastrar los restos de las soluciones empleadas en la primera etapa. Para esto, se añaden 500  $\mu$ l de solución RPE sobre la columna de lavado que se centrifuga de nuevo en las condiciones descritas. Este último paso se repite de nuevo, centrifugando a 10.000 rpm durante 2 minutos. Finalmente, tiene lugar una última etapa de desactivación de las columnas de lavado y elución del RNA total purificado. En este paso se añaden 30  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O tratada con DEPC sobre la columna de lavado que se centrifuga durante 1 minuto a 10.000 rpm. El eluido que se obtiene tras esta centrifugación contiene el RNA total purificado.

#### 3.2.3.3.3 Evaluación

La cantidad y calidad del RNA se estimaron a partir de una alícuota mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La evaluación por espectrofotometría se llevó a cabo con 1  $\mu$ l de muestra, midiendo la absorbancia a 260 y 280nm, a partir de estos valores, se determinó el ratio

de contaminación proteica y la concentración de RNA en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Para todas las muestras, los valores de los ratios se situaron dentro del rango óptimo (1.8-2.1).

La evaluación por electroforesis, se realizó cargando entre 0.5-1  $\mu\text{g}$  del RNA total obtenido con tampón de carga, en geles de agarosa (1% p/v) preparados en solución TAE que corrieron a 4°C durante 15 minutos a 80 voltios. Posteriormente, fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para su visualización con UVA en el transiluminador Gel-Doc 700 (Bio-Rad).

#### 3.2.3.4 cDNA

La síntesis y limpieza de los moldes de cDNA se realizó con los reactivos y columnas incluidos en el *kit One-Cycle cDNA Synthesis kit* de Affymetrix, siguiendo el protocolo del *Expression Analysis Technical Manual* de Affymetrix.

##### 3.2.3.4.1 Síntesis de cDNA monocatenario

En un primer paso, se sintetizan moldes de cDNA monocatenario (sscDNA) a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total. Los sscDNAs van a permitir la construcción de moldes bicatenarios de cDNA que son finalmente purificados.

Para este proceso se emplea como cebador 2  $\mu\text{l}$  del oligo T7-(dT)24 (100 pmoles) que se incuba con 1  $\mu\text{g}$  de RNA total durante 10 minutos a 70°C. Posteriormente, la mezcla se pone en hielo, se le añaden 4  $\mu\text{l}$  de 5x *First strand cDNA buffer*, 2  $\mu\text{l}$  0.1 M DTT y 1  $\mu\text{l}$  de 10 mM dNTPs, se atempera, se mezcla bien y se incuba a 42°C durante 2 minutos. Finalmente, se completa la mezcla con 1  $\mu\text{l}$  de *SuperScript II RT* (200U/ $\mu\text{l}$ ) y se incuba a 42°C durante 1 hora en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , para llevar a cabo la síntesis del sscDNA.

##### 3.2.3.4.2 Síntesis de cDNA bicatenario

La síntesis del cDNA bicatenario (dscDNA) se lleva a cabo añadiendo a la mezcla de síntesis de cDNA monocatenario 30  $\mu\text{l}$  de 5x *Second strand Reaction buffer*,



3 µl de 10 mM dNTPs, 1 µl de 10 U/µl *E. Coli* DNA ligasa, 4 µl de 40 U/µl *E. coli* DNA Polimerasa I y 1 µl de 2 U/µl *E. coli* RNasa H, para un volumen final de 150 µl en agua destilada tratada con DEPC. Esta mezcla se incuba a 16°C durante 2 horas. A continuación, se completa el proceso incubando la mezcla con 2 µl de 10 U/µl de T4 DNA Polimerasa a 16°C durante 5 minutos. La reacción se bloquea, finalmente, utilizando 10 µl de 0.5 M EDTA. Las muestras de dscDNA se conservan a -20°C hasta que son requeridas.

#### 3.2.3.4.3 Purificación

La purificación del dscDNA permite la eliminación de los restos de reactivos y enzimas procedentes de la reacción de síntesis. El proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente y empleando las columnas *Cleanup Spin Columns* del kit *GeneChip® Sample Cleanup Module* de Affymetrix.

El dscDNA se mezcla con 600 µl de *cDNA Binding Buffer*. Una vez mezclados bien, se añade 500 µl a las columnas que se centrifugan a 10.000 rpm durante 1 minuto. El eluido resultante se desecha inmediatamente después, se añaden 750 µl de *cDNA Wash Buffer* en las columnas que se centrifugan en las mismas condiciones. Este paso arrastra todos los componentes de la mezcla salvo el dscDNA.

El siguiente objetivo es secar la membrana de las columnas en la que se encuentra retenido el dscDNA. Para esto las columnas se centrifugan a velocidad máxima (14.000 rpm) durante 5 minutos. Una vez secas las columnas, el dscDNA purificado se recupera por elución en 14 µl de *cDNA Elution Buffer* tras centrifugación a velocidad máxima durante 1 minuto.

#### 3.2.3.5 cRNA

##### 3.2.3.5.1 Transcripción *in vitro* de cRNA biotinilado

El ensayo de transcripción *in vitro* de cRNA biotinilado permite, a partir de los moldes de dscDNA generados, sintetizar copias de RNA marcado con biotina y

aumentar la cantidad de RNA disponible. Para llevarlo a cabo se siguió el protocolo del *IVT Labeling kit* de Affymetrix.

Se prepara una mezcla con 10  $\mu$ l de dsDNA, 4  $\mu$ l de 10x *HY Reaction Buffer*, 4  $\mu$ l de 10x ribonucleótidos marcados con biotina, 4  $\mu$ l de 10x DTT, 4  $\mu$ l de 10x Inhibidor de RNAsas y 2  $\mu$ l de 20x T7 RNA Polimerasa en un volumen final de 40  $\mu$ l. La reacción tiene lugar incubando la mezcla en un baño de agua a 37°C durante 5 horas, agitando cada 30-45 minutos.

#### 3.2.3.5.2 Purificación

La cuantificación óptima del cRNA obtenido, se realiza mediante la purificación de las muestras eliminando los dNTPs biotinilados no incorporados y los residuos de la reacción de síntesis previa. El cRNA así sintetizado, se purificó con el *GeneChip Sample Cleanup Module* de Affymetrix.

A las muestras de cRNA biotinilado se le añaden 60  $\mu$ l de agua destilada tratada con DEPC, 350  $\mu$ l de *IVT cRNA Binding Buffer* y 250  $\mu$ l de etanol 100%. Se mezcla con vórtex y se cargan 700  $\mu$ l en las columnas que se centrifugan a 10.000 rpm durante 15 segundos. El eluido se desecha, se añaden 500  $\mu$ l de *IVT cRNA Wash Buffer* y se centrifuga en las mismas condiciones. Posteriormente, se añaden 500  $\mu$ l de etanol 80% (v/v) y se centrifuga de nuevo en las condiciones ya mencionadas. Por último, se secan las columnas en la que se encuentra retenido el cRNA y se centrifugan a velocidad máxima (14.000 rpm) durante 5 minutos y se recupera el cRNA disuelto en 22  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O libre de RNAsas.

#### 3.2.3.5.3 Evaluación cRNA

El cRNA purificado es evaluado cuantitativamente y cualitativamente para comprobar el volumen obtenido y la integridad de la muestra.

- Cuantificación

La cuantificación de las muestras de cRNA purificado se realiza siguiendo el procedimiento habitual por espectrofotometría, midiendo la absorción a 260nm. La pureza de las mismas se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280nm (Abs260/Abs280nm). Sin embargo, cuando se parte de muestras iniciales de RNA total, es necesario corregir la cantidad de cRNA obtenida mediante la medición de la absorción a 260nm, con la siguiente fórmula:

$$\text{Corrección cRNA} = \text{RNAm} - (\text{RNA}_i \text{ total})(Y),$$

donde RNAm es la cantidad en µg de cRNA obtenido tras la transcripción *in vitro* y cuantificado por la medición de la absorbancia a 260nm; RNA<sub>i</sub> total es la cantidad en µg de RNA total de la que se partió, e Y es la fracción de cDNA empleada para el ensayo de síntesis de cRNA. Este ajuste es necesario para calcular la cantidad de cRNA que se desea fragmentar y permite aproximar la cuantificación obtenida a la cantidad de cRNA biotilado en función del rendimiento real de la reacción, descartando sobreestimaciones debidas al origen de la muestra (RNA total).

- Electroforesis

Tras incubar las muestras durante 5 minutos a 65°C, se cargaron en un gel de agarosa (1% p/v), preparado en solución TAE, el 1% del volumen final de la mezcla de cRNA purificado. La electroforesis del cRNA purificado se lleva a cabo a 4°C durante 15 minutos a 80 voltios. Posteriormente, fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) para su visualización con UVA.

3.2.3.5.4 *Fragmentación del cRNA*

La presencia en los *microarrays* de Affymetrix de múltiples sondas correspondientes a distintas regiones de los genes que se desean estudiar exige la fragmentación controlada de las muestras del cRNA obtenido. Este proceso nos permite la hibridación de las distintas regiones de los genes con sus sondas complementarias.

La fragmentación de las muestras de cRNA se realizó con la solución de fragmentación incluida en el *GeneChip® Sample Cleanup Module*. A partir de 15 µg de cRNA se añadieron 8 µl de 5x *Fragmentation Buffer*, para un volumen final de 40 µl de agua destilada libre de RNAsas. Finalmente, las muestras se incuban a 94°C durante 35 minutos para llevar a cabo la fragmentación.

#### 3.2.3.5.5 Evaluación del cRNA fragmentado

El cRNA fragmentado se evalúa cualitativamente para garantizar que el proceso de fragmentación se ha realizado de forma homogénea.

#### - Electroforesis

La evaluación de las muestras fragmentadas se llevó a cabo en un gel de agarosa (1% p/v), preparado en solución TAE, cargando 0,75 µg por muestra, tras incubar las muestras durante 5 minutos a 65°C. La electroforesis del cRNA fragmentado se lleva a cabo a 4°C durante 15 minutos a 80 voltios. Posteriormente, fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) para su visualización con UVA.

#### 3.2.3.6 Microarrays de oligonucleótidos

##### 3.2.3.6.1 Hibridación

Las muestras se hibridaron en el *GeneChip® Human Genome Focus Array* de Affymetrix. Este *microarray* incluye 8500 secuencias verificadas y contrastadas con la base de datos RefSeq del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) correspondientes a genes del genoma humano.

La hibridación de las muestras en los *microarrays* se realizó según las indicaciones descritas por el fabricante (*Expression Analysis Technical Manual*, Affymetrix). A partir de los valores ajustados de rendimiento corregido de cRNA se tomaron 15 µg de las muestras, que se añadieron a la mezcla de hibridación preparada con 5 µl de oligo control B2 (3 nM), 15 µl de controles de hibridación (20x) (*bioB*,

*bioC*, *bioD*, *cre*), 3 µl de DNA de esperma de arenque (0,01 mg), 3 µl de BSA acetilada (50 mg/ml) y 150 µl de tampón de hibridación (1x), hasta un volumen final de 300 µl en agua destilada libre de RNAsas. Esta mezcla incluye los controles de hibridación internos necesarios como referencia en la lectura de los *microarrays*. Además, permiten evaluar la eficiencia de hibridación del ensayo y determinar el factor de escalado para la normalización.

La mezcla preparada se incubó durante 5 minutos a 99°C. Mientras, se atemperó el *GeneChip® Human Genome Focus Array* de Affymetrix, y durante 10 minutos se mantuvo con tampón de hibridación (1x) a 45°C. Posteriormente, la mezcla se incubó 5 minutos a 45°C y se eliminó el tampón de hibridación del *GeneChip® Human Genome Focus Array*. Finalmente, se añadió la mezcla al *GeneChip® Human Genome Focus Array* y el proceso de hibridación tuvo lugar en el horno de hibridación *GeneChip® 640* a 45°C durante 16 horas y 60 rpm.

#### 3.2.3.6.2 Lavados y tinción

Los *microarrays* ya hibridados se colocaron en las carcasas de lavado y tinción del *GeneChip® Fluidics Station 400* y se efectuaron de forma automatizada los siguientes pasos:

- *Lavado 1*: Consta de 10 ciclos de 2 lavados cada uno con Solución de Lavado A a 25°C.
- *Lavado 2*: Constituido por 4 ciclos de 15 lavados cada uno con Solución de Lavado B a 50°C.
- *Tinción 1*: Los *microarrays* se tratan durante 10 minutos con Solución de tinción estreptavidina/ficoeritrina (SAPE) a 25°C.
- *Lavado post-tinción*: Se llevan a cabo 10 ciclos de 4 lavados cada uno con Solución de Lavado A a 25°C.

- *Tinción 2:* Tratamiento de 10 minutos con Solución de anticuerpos a 25°C.
- *Tinción 3:* Tratamiento de 10 minutos con Solución SAPE a 25°C.
- *Lavado final:* Consta de 15 ciclos de 4 lavados cada uno con Solución de Lavado A a 30°C.

Estas series de lavados permiten la tinción con ficoeritrina/estreptavidina de las muestras hibridadas. La biotina, asociada al anticuerpo antiestreptavidina conjugado con las muestras ya hibridadas y teñidas, es responsable de la emisión lumínica que será detectada por el *scanner* para la lectura de los *microarrays*.

### 3.2.4 Análisis Bioinformático

#### 3.2.4.1 Análisis de imagen y normalización

Mediante el *GeneArray® Scanner*, se leyeron los valores de luminiscencia correspondientes a cada una de las muestras hibridadas. A continuación, como paso previo a la comparación de los *arrays* los valores obtenidos son normalizados con el objetivo de minimizar las variaciones en la señal detectada cuyo origen no es biológico sino técnico y/o instrumental (p. ej. variaciones en el marcaje de las muestras, fotodetección, hibridación, etc.). Para la normalización de los valores de expresión obtenidos se utilizó el programa de Affymetrix GCOS 1.3, todos los *arrays* se escalaron definiendo como la intensidad media el valor arbitrario de 100. GCOS calcula la intensidad media de todo el *array* promediando los valores de intensidad de todos los grupos de sondas a excepción del 2% de los valores con mayor y menor intensidad. Esa intensidad media es multiplicada por un factor de escalado que la convertirá en el valor definido por el usuario (en este caso 100). El factor de escalado de los *arrays* del mismo experimento debe ser próximo entre ellos (sin que el factor de escalado de un *array* sea superior a tres veces el de cualquiera de los otros) y cercano a 1 en la medida de lo posible.

### 3.2.4.2 Algoritmos estadísticos de Affymetrix

El programa Affymetrix®*MicroArray Suite* 5.0 emplea 3 algoritmos estadísticos que analizan los datos de expresión de forma paralela (*Statistical Algorithms Description Document*, <http://www.affymetrix.com/>):

1. El Valor de la Señal determina la medida de la abundancia del transcrito en la muestra.
2. El Algoritmo de Detección (Detection Call) determina si existe expresión de un gen concreto en la muestra hibridada. Este algoritmo devuelve una salida con los valores P (Presente), A (Ausente) y M (Marginal) para cada uno de los genes en cada uno de los *arrays*.
3. p-valor del algoritmo de detección determina el nivel de significación de la calificación cualitativa de detección de la muestra.

### 3.2.4.3 Análisis descriptivo según el algoritmo de detección

El análisis descriptivo de la expresión diferencial de los genes estudiados entre los distintos tipos de tejido, se llevó a cabo a partir de los datos obtenidos mediante el algoritmo de detección.

Se consideró que un gen estaba expresado en un tipo de tejido concreto, siempre que estuviera presente en siete o más muestras estudiadas de ese tipo de tejido, y se consideró que no se expresaba cuando estaba presente en tres o menos muestras estudiadas (tabla 7).

| Gen          | Nº muestras presente* |
|--------------|-----------------------|
| Expresado    | 7-10                  |
| No expresado | 0-3                   |

**Tabla 7.-** Agrupación de los genes en expresados y no expresados para cada tipo de tejido estudiado.

\* Muestras presentes, según el algoritmo de detección de Affymetrix.

#### 3.2.4.4 Análisis Estadístico según el valor de señal

El análisis estadístico se llevó a cabo a partir de los valores de señal obtenidos desde los *microarrays*. El análisis estadístico se realizó para la obtención de grupos de genes con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tejidos a estudiar. Las pruebas estadísticas empleadas, fueron el análisis de la varianza (ANOVA) y la t-Student, con la corrección de Bonferroni para hipótesis múltiples, para descartar la mayor cantidad posible de falsos positivos en el análisis<sup>327</sup>. Este análisis se realizó con el programa Acuity 4.0 (Axon Instruments Inc.).

Posteriormente, para aquellos genes que mostraron diferencias significativas, se calculó el logaritmo en base dos del ratio (SLR) de los valores de señal al comparar su nivel de expresión entre dos tipos de tejidos distintos. Los genes que mostraron un  $SLR \leq -1$  se consideraron reprimidos en su expresión, y aquellos que mostraron un  $SLR \geq 1$  se consideraron sobreexpresados. Este análisis se realizó mediante el programa SPSS 13.0.

#### 3.2.4.5 Algoritmos de agrupamiento

A partir de los valores de señal de los genes con diferencias significativas obtenidos mediante el ANOVA, se llevó a cabo el análisis y construcción de los agrupamientos génicos. Este tipo de análisis permite agrupar genes con perfiles de expresión similares y estudiar sus relaciones y comportamiento en función de una determinada variable. Para implementar los algoritmos de agrupamiento se empleó el programa Acuity 4.0. (Axon Instruments Inc.).

Los algoritmos utilizados para los estudios de agrupamientos génicos fueron: el algoritmo de agrupamiento jerarquizado<sup>328</sup> y el análisis por componentes principales<sup>329</sup>.



#### 3.2.4.5.1 Algoritmos de agrupamiento jerarquizado

La construcción de los agrupamientos jerarquizados se realizó mediante el empleo del coeficiente de correlación centrado de Pearson, como método de cálculo de similitud entre los vectores de expresión génica. La construcción de los dendrogramas se realizó con el método de ligamiento promedio (*average-linkage method*) que selecciona la distancia promedio entre las agrupaciones génicas (*clusters*).

#### 3.2.4.5.2 Algoritmo de Análisis por Componentes Principales (ACP)

El análisis por componentes principales se realizó mediante la obtención de combinaciones lineales de los valores señal, para reducir la dimensionalidad de los datos de forma que expliquen la mayor cantidad de variabilidad posible entre los *arrays* a estudiar, recogiendo las primeras componentes más del 70% de la variabilidad total. La visualización se da a partir de gráficas tridimensionales (*Boxplots*).

#### 3.2.4.6 Bases de datos

La gestión de la base de datos con las anotaciones de los genes se realizó con el módulo de SQLServer incluido en el programa Acuity 4.0. Las anotaciones actualizadas de los genes presentes en el *microarray* HG-Focus fueron obtenidas desde el Centro de Análisis NetAffx<sup>TM</sup> de Affymetrix<sup>TM</sup> (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). El servidor web FatiGO<sup>330</sup> (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/index.html>) se empleó para el rastreo de funciones y procesos biológicos definidos según el Gene Ontology<sup>331</sup> (<http://www.geneontology.org/>). La búsqueda bibliográfica se realizó mediante los servidores web iHOP<sup>332</sup> (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>), PubMed ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)) y Google académico ([www.google.es](http://www.google.es)).





## **4. RESULTADOS**

---



## **4.1 Estudio Inmunohistoquímico**

### **4.1.1 Tejido Sano**

#### 4.1.1.1 Población. Características clínicas y anatomopatológicas

**S**e estudiaron 10 muestras de tejido no patológico obtenido a más de 2 centímetros del tumor, procedentes de 10 pacientes sometidos a resección quirúrgica que no hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia previa.

Los 10 pacientes fueron varones (100%), con edades comprendidas entre los 51 y 76 años ( $64,8 \pm 8,06$ ). Tres pacientes (30%) eran fumadores y 7 ex-fumadores (70%) en el momento del diagnóstico (tabla 8).

El estudio anatomopatológico de las citadas muestras confirmó que las mismas se habían obtenido del parénquima alveolar sano de los pacientes.

| Características poblacionales       |                | Pacientes | Porcentaje |
|-------------------------------------|----------------|-----------|------------|
| <b>Sexo</b>                         | Varón          | 10        | 100%       |
|                                     | Mujer          | 0         | 0          |
| <b>Edad</b><br>$64,8 \pm 8,06$ años | $\leq 64$ años | 4         | 40%        |
|                                     | $> 64$ años    | 6         | 60%        |
| <b>Hábito tabáquico</b>             | Fumador        | 3         | 30%        |
|                                     | Ex-fumador     | 7         | 70%        |
|                                     | No fumador     | 0         | 0          |

**Tabla 8.-** Características poblacionales de los pacientes en los que se obtuvo el tejido sano.

#### 4.1.1.2 Estudio de la expresión de los factores de la familia del VEGF y sus receptores

Tras realizar el estudio de la expresión de los distintos factores y receptores de la familia del VEGF en los tejidos obtenidos del parénquima alveolar sano de los

pacientes, se pudo observar en las células epiteliales del tipo neumocito II que, en 7 tejidos (70%) se expresaba VEGF-A, en 1 (10%) se expresaba VEGF-B, en los 10 tejidos estudiados (100%) se expresaba VEGF-D, en 4 (40%) se expresaba VEGFR1, en 1 (10%) se expresaba VEGFR2 y, finalmente, en 1 (10%) se expresaba VEGFR3.

Además, la expresión de los factores VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D y del receptor VEGFR1 se observó en el endotelio de los septos alveolares de los tejidos obtenidos del parénquima alveolar sano de los pacientes, donde 10 tejidos (100%) mostraban expresión para VEGF-A y VEGF-D, 1 (10%) expresaba VEGF-B y en 7 (70%) se expresaba VEGFR1 (tabla 9 y figura 33).

| Factores y Receptores | Epitelio alveolar |           | Endotelio alveolar |           |
|-----------------------|-------------------|-----------|--------------------|-----------|
|                       | Si                | No        | Si                 | No        |
| VEGF-A                | 7 (70%)           | 3 (30%)   | 10 (100%)          | 0         |
| VEGF-B                | 1 (10%)           | 9 (90%)   | 1 (10%)            | 9 (90%)   |
| VEGF-C                | 0                 | 10 (100%) | 0                  | 10 (100%) |
| VEGF-D                | 10 (100%)         | 0         | 10 (100%)          | 0         |
| VEGFR1                | 4 (40%)           | 6 (60%)   | 7 (70%)            | 3 (30%)   |
| VEGFR2                | 1 (10%)           | 9 (90%)   | 0                  | 10 (100%) |
| VEGFR3                | 1 (10%)           | 9 (90%)   | 0                  | 10 (100%) |

**Tabla 9.-** Resultados de la expresión de los factores de la familia del VEGF y sus receptores en muestras de parénquima alveolar sano.

## 4.1.2 Tejido Tumoral

### 4.1.2.1 Población. Características clínicas y anatomopatológicas

Se estudiaron 59 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no habiendo recibido radioterapia y/o quimioterapia previa, de los cuales 22 (37,3%) fueron sometidos a resección quirúrgica. Cincuenta y cuatro eran varones (91,5%) y 5 mujeres (8,5%), con edades comprendidas entre los 44 y 88 años ( $67,47 \pm 9,73$ ). Cincuenta y cinco pacientes eran fumadores o ex-fumadores (96,5%) en el momento del diagnóstico, sólo 2 pacientes (3,5%) negaron tabaquismo activo durante su vida, aunque reconocieron ser fumadores pasivos en su domicilio y trabajo, en otros 2 pacientes se desconoce el hábito tabáquico (tabla 10).

Nueve pacientes (15,5%) no presentaban síntomas en el momento del diagnóstico, 25 (43,1%) presentaban tos, 18 (31%) hemoptisis, 15 (25,8%) dolor torácico, 8 (13,7%) fiebre, 27 (46,5%) síndrome constitucional, 3 (5,1%) síndrome paraneoplásico, 1 (1,7%) metástasis a distancia y 1 (1,7%) síndrome de vena cava, en 1 paciente no se dispone de los datos sobre los síntomas y signos que presentó al diagnóstico.

| Características poblacionales |                  | Pacientes       | Porcentaje |      |
|-------------------------------|------------------|-----------------|------------|------|
| Sexo                          | Varón            | 54              | 91,5       |      |
|                               | Mujer            | 5               | 8,5        |      |
| Edad<br>67,47±9,73 años       | ≤67 años         | 27              | 45,8       |      |
|                               | >67 años         | 32              | 54,2       |      |
| Hábito tabáquico              | Fumador          | 23              | 40,4       |      |
|                               | Ex-fumador       | 32              | 56,1       |      |
|                               | No fumador       | 2               | 3,5        |      |
| Características radiológicas  |                  | Pacientes       | Porcentaje |      |
| Localización                  | Pulmón derecho   | Lóbulo superior | 21         | 36,2 |
|                               |                  | Lóbulo medio    | 5          | 8,6  |
|                               |                  | Lóbulo inferior | 9          | 15,5 |
|                               | Pulmón izquierdo | Lóbulo superior | 16         | 27,6 |
|                               |                  | Lóbulo inferior | 7          | 12,1 |
| Tamaño<br>5,7±2,8 cm          | ≤ 6 cm           | 33              | 64,7       |      |
|                               | > 6 cm           | 18              | 35,3       |      |
| Características patológicas   |                  | Pacientes       | Porcentaje |      |
| Estirpe histológica           | Adenocarcinoma   | 15              | 25,4       |      |
|                               | Epidermoide      | 25              | 42,4       |      |
|                               | Células grandes  | 8               | 13,6       |      |
|                               | Células pequeñas | 11              | 18,6       |      |
| Estadio                       | I                | 12              | 20,7       |      |
|                               | II               | 5               | 8,6        |      |
|                               | III              | 26              | 44,8       |      |
|                               | IV               | 15              | 25,9       |      |

**Tabla 10.-** Características demográficas-clínico-patológicas de los pacientes en los que se estudió tejido tumoral.



Treinta y cinco pacientes (60,3%) presentaban localización de la masa tumoral en el pulmón derecho, con la siguiente distribución regional; 21 (36,2%) en el lóbulo superior, 5 (8,6%) en el lóbulo medio y 9 (15,5%) en el lóbulo inferior. Veintitrés pacientes presentaban localización de la masa tumoral en el pulmón izquierdo (39,7%), con la siguiente distribución regional; 16 (27,5%) en el lóbulo superior y 7 (12%) en el lóbulo inferior, en 1 de los pacientes estudiados no se dispone del dato de la localización tumoral. El tamaño del tumor en los 51 pacientes en los que se disponía de esta información, estaba comprendido entre 1 y 15 centímetros ( $5,7 \pm 2,8$ ) (tabla 10).

Once pacientes presentaron tumores de células pequeñas (18,6%), y 48 pacientes mostraban tumores de la estirpe no microcíticos (81,4%), 15 (25,4%) del tipo adenocarcinoma, 25 (42,4%) del tipo epidermoide y 8 (13,6%) del tipo células grandes. Doce pacientes (20,7%) se clasificaron como estadio I u oculto, 5 (8,6%) como estadio II, 26 (44,8%) como estadio III, 15 (25,9%) como estadio IV y en 1 no se dispone de esta información (tabla 10).

Veintidós pacientes (37,3%) fueron intervenidos quirúrgicamente para la resección del tumor. La estadificación clínica o prequirúrgica para estos pacientes fue de 14 pacientes con estadio I (63,6%) y 8 pacientes con estadio III (36,4%), mientras que la estadificación patológica o post-quirúrgica fue de 10 pacientes con estadio I u oculto (45,5%), 5 pacientes con estadio II (22,7%) y 7 pacientes con estadio III (31,8%) (tabla 11). Una vez realizado el estudio anatomopatológico posterior a la cirugía, 10 pacientes fueron reestadiados. Tres pacientes pasaron del estadio I al estadio II, otros 3 del estadio I al estadio III, 2 del estadio III al estadio II y 2 pacientes pasaron del estadio III al estadio I. Como resultado final, la estadificación post-quirúrgica clasificó a 10 pacientes como estadio I u oculto (45,5%), 5 pacientes como estadio II (22,7%) y 7 pacientes como estadio III (31,8%).

| Estadios | Clínico    | Post-quirúrgico |
|----------|------------|-----------------|
| I        | 14 (63,6%) | 10 (45,5%)      |
| II       | 0          | 5 (22,7%)       |
| III      | 8 (36,4%)  | 7 (31,8%)       |

Tabla 11.- Estadificación pacientes quirúrgicos.

#### 4.1.2.2 Estudio de la expresión de los factores de la familia del VEGF y sus receptores

##### 4.1.2.2.1 *Expresión en células tumorales*

De los 59 pacientes estudiados, 56 pacientes (94,9%) presentaban expresión de alguno de los factores de la familia del VEGF en las células tumorales. El resultado del análisis de la expresión se muestra en las [tablas 12 y 13](#).

Cuarenta y un pacientes (69,5%) mostraron, en la muestra estudiada, expresión para VEGF-A: 8 tumores (13,6%) presentaron niveles altos de expresión, 12 (20,3%) niveles moderados y 21 (35,6%) niveles bajos.

Veinticinco pacientes (42,4%) mostraron, en la muestra estudiada, expresión para VEGF-B: 5 tumores (8,5%) presentaron niveles altos de expresión, 4 (6,8%) niveles moderados y 16 (27,1%) niveles bajos.

Cuarenta y dos pacientes (71,2%) mostraron, en la muestra estudiada, expresión para VEGF-C: 11 tumores (18,6%) presentaron niveles altos de expresión, 6 (10,2%) niveles moderados y 25 (42,4%) niveles bajos.

Finalmente, de los 35 pacientes (59,3%) en cuya muestra se expresaba VEGF-D: 3 tumores (5,1%) presentaron niveles altos de expresión, 9 (15,3%) niveles moderados y 23 (39%) niveles bajos.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la expresión de VEGF-A y VEGF-C ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ), y para los niveles de expresión de VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ). La media de expresión para VEGF-A fue de  $1,17 \pm 1,02$ , para VEGF-B  $0,66 \pm 0,94$ , para VEGF-C  $1,19 \pm 1,05$  y para VEGF-D  $0,85 \pm 0,86$  ([figura 11](#)).

| Factores y Receptores |           | Expresión Media | Expresión            |            | p-valor ( $\chi^2$ ) |                 |
|-----------------------|-----------|-----------------|----------------------|------------|----------------------|-----------------|
|                       |           |                 | Si                   | No         |                      |                 |
| VEGF-A                |           | 1,17±1,02       | 41 (69,5%)           | 18 (30,5%) | p=0.003*             |                 |
| VEGF-B                |           | 0,66±0,94       | 25 (42,4%)           | 34 (57,6%) | p=0.241              |                 |
| VEGF-C                |           | 1,19±1,05       | 42 (71,2%)           | 17 (28,8%) | p=0.001*             |                 |
| VEGF-D                |           | 0,85±0,86       | 35 (59,3%)           | 24 (40,7%) | p=0.152              |                 |
| VEGFR1                |           | 1,47±1,07       | 47 (79,6%)           | 12 (20,4%) | p=0.00005*           |                 |
| VEGFR2                |           | 1,63±1,03       | 50 (84,7%)           | 9 (15,3%)  | p=0.00009*           |                 |
| VEGFR3                |           | 1,36±0,96       | 48 (81,3%)           | 11 (18,7%) | p=0.00001*           |                 |
| Edad                  |           | Expresión Media | Expresión            |            | p-valor ( $\chi^2$ ) |                 |
|                       |           |                 | Si                   | No         |                      |                 |
| VEGF-A                | ≤ 67 años | 0,96±0,98       | p=0,139              | 17 (28,8%) | 10 (16,9%)           | p=0,474         |
|                       | > 67 años | 1,34±1,03       |                      | 24 (40,7%) | 8 (13,6%)            |                 |
| VEGF-B                | ≤ 67 años | 0,48±0,84       | p=0,152              | 9 (15,3%)  | 18 (30,5%)           | p=0,305         |
|                       | > 67 años | 0,81±0,99       |                      | 16 (27,1%) | 16 (27,1%)           |                 |
| VEGF-C                | ≤ 67 años | 0,59±0,79       | p=0,0002*            | 12 (22,3%) | 15 (25,4%)           | p=0,0001*       |
|                       | > 67 años | 1,69±0,99       |                      | 30 (50,8%) | 2 (3,4%)             |                 |
| VEGF-D                | ≤ 67 años | 0,74±0,85       | p=0,348              | 14 (23,7%) | 13 (22%)             | p=0,42          |
|                       | > 67 años | 0,94±0,87       |                      | 21 (35,6%) | 11 (28,6%)           |                 |
| VEGFR1                | ≤ 67 años | 1,11±0,93       | p=0,018*             | 20 (33,9%) | 7 (11,9%)            | p=0,513         |
|                       | > 67 años | 1,78±1,09       |                      | 27 (45,8%) | 5 (7,8%)             |                 |
| VEGFR2                | ≤ 67 años | 1,48±0,97       | p=0,324 <sup>‡</sup> | 23 (39%)   | 4 (6,8%)             | p=1 (Fisher)    |
|                       | > 67 años | 1,75±1,07       |                      | 27 (45,8%) | 5 (7,8%)             |                 |
| VEGFR3                | ≤ 67 años | 1,11±0,84       | p=0,076              | 21 (35,6%) | 6 (10,2%)            | p=0,754         |
|                       | > 67 años | 1,56±1,01       |                      | 27 (45,8%) | 5 (7,8%)             |                 |
| Tamaño                |           | Expresión Media | Expresión            |            | p-valor ( $\chi^2$ ) |                 |
|                       |           |                 | Si                   | No         |                      |                 |
| VEGF-A                | ≤ 6 cm    | 1,24±1,00       | p=0,274              | 24 (47,1%) | 9 (17,6%)            | p=0,59          |
|                       | > 6 cm    | 0,94±0,99       |                      | 11 (21,6%) | 7 (13,7%)            |                 |
| VEGF-B                | ≤ 6 cm    | 0,76±0,96       | p=0,299              | 16 (31,4%) | 17 (33,3%)           | p=0,454         |
|                       | > 6 cm    | 0,50±0,85       |                      | 6 (11,8%)  | 12 (23,5%)           |                 |
| VEGF-C                | ≤ 6 cm    | 1,21±1,19       | p=0,942              | 21 (41,2%) | 12 (23,5%)           | p=0,469         |
|                       | > 6 cm    | 1,06±0,80       |                      | 14 (27,5%) | 4 (7,8%)             |                 |
| VEGF-D                | ≤ 6 cm    | 1,03±1,04       | p=0,244              | 19 (37,3%) | 14 (27,5%)           | p=1             |
|                       | > 6 cm    | 0,61±0,50       |                      | 11 (21,6%) | 7 (13,7%)            |                 |
| VEGFR1                | ≤ 6 cm    | 1,55±1,17       | p=0,478              | 26 (51%)   | 7 (13,7%)            | p=1 (Fisher)    |
|                       | > 6 cm    | 1,28±0,95       |                      | 14 (27,5%) | 4 (7,8%)             |                 |
| VEGFR2                | ≤ 6 cm    | 1,48±1,09       | p=0,150              | 26 (51%)   | 7 (13,7%)            | p=0,46 (Fisher) |
|                       | > 6 cm    | 1,94±1,05       |                      | 16 (31,4%) | 2 (3,9%)             |                 |
| VEGFR3                | ≤ 6 cm    | 1,39±0,99       | p=0,733              | 27 (52,9%) | 6 (11,8%)            | p=0,72 (Fisher) |
|                       | > 6 cm    | 1,28±0,95       |                      | 14 (27,5%) | 4 (7,8%)             |                 |

**Tabla 12.-** Resultados de la expresión de los factores de la familia del VEGF y de sus receptores en célula tumoral y respecto a la edad de los pacientes y el tamaño del tumor.

<sup>‡</sup> Se aplicó T-student.

| Factores y Receptores | Niveles de Expresión |            |            |            | p-valor ( $\chi^2$ ) |
|-----------------------|----------------------|------------|------------|------------|----------------------|
|                       | Nula                 | Baja       | Moderada   | Alta       |                      |
| VEGF-A                | 18 (30,5%)           | 21 (35,6%) | 12 (20,3%) | 8 (13,6%)  | p=0,073              |
| VEGF-B                | 34 (57,6%)           | 16 (27,1%) | 4 (6,8%)   | 5 (8,5%)   | p= 0,00000001*       |
| VEGF-C                | 17 (28,8%)           | 25 (42,4%) | 6 (10,2)   | 11 (18,6%) | p=0,03*              |
| VEGF-D                | 24 (40,7%)           | 23 (39%)   | 9 (15,3%)  | 3 (5,1%)   | p=0,00006*           |
| VEGFR1                | 12 (20,3%)           | 21 (35,6%) | 12 (20,3%) | 14 (23,7%) | p=0,294              |
| VEGFR2                | 9 (15,3%)            | 19 (32,2%) | 16 (27,1%) | 15 (25,4%) | p=0,311              |
| VEGFR3                | 11 (18,6%)           | 25 (42,4%) | 14 (23,7%) | 9 (15,3%)  | p=0,016*             |

**Tabla 13.-** Niveles de expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral.

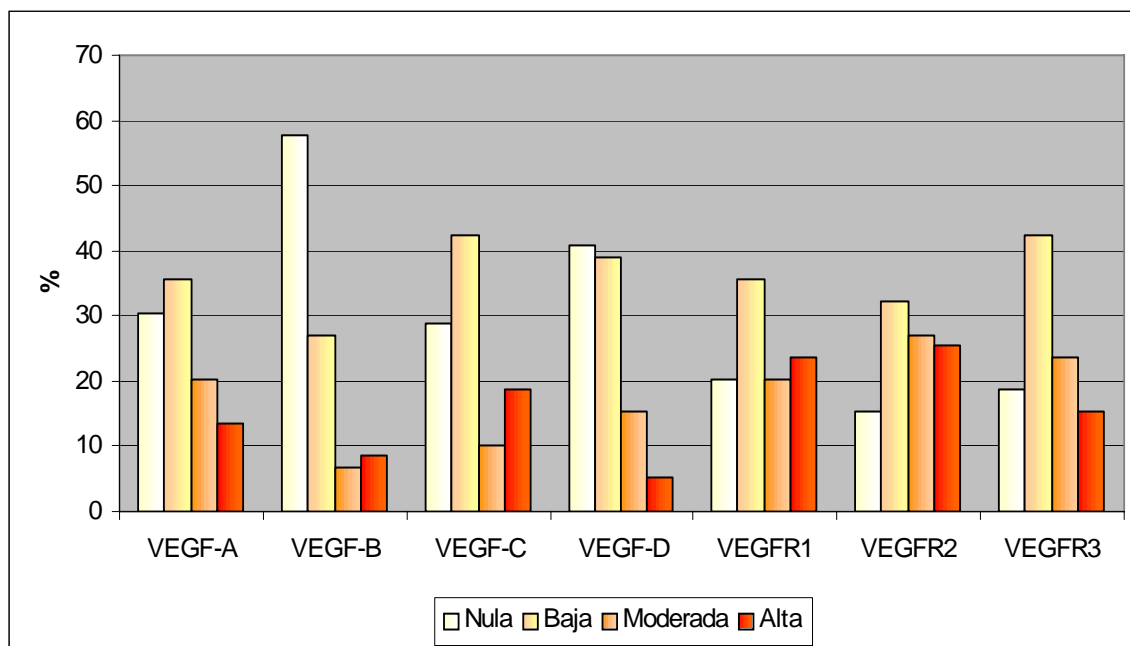
Todas las muestras estudiadas (100%) presentaban expresión de alguno de los receptores para los factores de la familia del VEGF en la membrana y/o citosol de las células tumorales. El resultado del análisis de la expresión se muestra en la [tabla 12](#) y [tabla 13](#).

Cuarenta y siete pacientes (79,6%) mostraron, en la muestra estudiada, expresión para VEGFR1: 14 (23,7%) presentaron niveles altos de expresión, 12 (20,3%) niveles moderados y 21 (35,6%) niveles bajos.

Cincuenta pacientes (84,7%) mostraron, en la muestra estudiada, expresión para VEGFR2: 15 tumores (25,4%) presentaron niveles altos de expresión, 16 (27,1%) niveles moderados y 19 (32,2%) niveles bajos.

Finalmente, de los 48 pacientes (81,3%) en cuyas muestras se expresaba VEGFR3: 9 tumores (15,3%) presentaron niveles altos de expresión, 14 (23,7%) niveles moderados y 25 (42,4%) niveles bajos.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la expresión de los tres receptores en la membrana y/o citosol de las células tumorales ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) y para los niveles de expresión de VEGFR3. La media de expresión para VEGFR1 fue de  $1,47 \pm 1,07$ , para VEGFR2 de  $1,63 \pm 1,03$ , y para VEGFR3 de  $1,36 \pm 0,96$  ([figura 11](#)).



**Figura 11.-** Niveles de expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral.

#### 4.1.2.2.1.1 Expresión en células tumorales según la edad y el tamaño del tumor

En muestras de 30 (93,8%) pacientes mayores de 67 años se observó expresión de VEGF-C, mientras que sólo se detectó en muestras de 12 (44,4%) de los pacientes estudiados menores de 67 años ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (tabla 12).

Para los pacientes menores de 67 años, la media de expresión para VEGF-C y VEGFR1 fue de  $0,59 \pm 0,79$  y  $1,11 \pm 0,93$  respectivamente, mientras que para los mayores de 67 años fue de  $1,69 \pm 0,99$  y  $1,78 \pm 1,09$  respectivamente, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , U de Mann-Whitney). El resto de los factores y receptores no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad (tabla 12).

El análisis de la expresión respecto al tamaño del tumor no mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los factores y receptores estudiados.

| Localización del tumor | VEGF-A           |            | VEGF-B               |            | VEGF-C          |            | VEGF-D               |            |
|------------------------|------------------|------------|----------------------|------------|-----------------|------------|----------------------|------------|
|                        | Si               | No         | Si                   | No         | Si              | No         | Si                   | No         |
| LSD <sup>†</sup>       | 13 (22,4%)       | 8 (13,8%)  | 8 (13,8%)            | 13 (22,4%) | 17 (29,3%)      | 4 (6,9%)   | 11 (19%)             | 10 (17,2%) |
| Otras localizaciones   | 28 (48,3%)       | 9 (15,5%)  | 16 (43,2%)           | 21 (56,8%) | 24 (41,4%)      | 13 (22,4%) | 23 (39,7%)           | 14 (24,1%) |
| p-valor ( $\chi^2$ )   | p=0,42           |            | p=0,916              |            | p=0,32          |            | p=0,653              |            |
| LMD                    | 5 (8,6%)         | 0          | 2 (3,4%)             | 3 (5,2%)   | 2 (3,4%)        | 3 (5,2%)   | 3 (5,2%)             | 2 (3,4%)   |
| Otras localizaciones   | 36 (62,1%)       | 17 (29,3%) | 22 (37,9%)           | 31 (53,4%) | 39 (67,2%)      | 14 (24,1%) | 31 (53,4%)           | 22 (37,9%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,308          |            | p=1                  |            | p=0,144         |            | p=1                  |            |
| LID                    | 9 (15,5%)        | 0          | 7 (12,1%)            | 2 (3,4%)   | 7 (12,1%)       | 2 (3,4%)   | 7 (12,1%)            | 2 (3,4%)   |
| Otras localizaciones   | 32 (55,2%)       | 17 (29,3%) | 17 (29,3%)           | 32 (55,2%) | 34 (58,6%)      | 15 (29,5%) | 27 (46,6%)           | 22 (37,9%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,047*         |            | p=0,026*             |            | p=1             |            | p=0,282              |            |
| LSI                    | 13 (22,4%)       | 3 (5,2%)   | 5 (8,6%)             | 11 (19%)   | 10 (17,2%)      | 6 (10,3%)  | 10 (17,2%)           | 6 (10,3%)  |
| Otras localizaciones   | 28 (48,3%)       | 14 (24,1%) | 19 (32,8%)           | 23 (39,7%) | 31 (53,4%)      | 11 (19%)   | 24 (41,4%)           | 18 (31%)   |
| p-valor                | p=0,347 (Fisher) |            | p=0,504 ( $\chi^2$ ) |            | p=0,52 (Fisher) |            | p=0,943 ( $\chi^2$ ) |            |
| LII                    | 1 (1,7%)         | 6 (10,3%)  | 2 (3,4%)             | 5 (8,6%)   | 5 (8,6%)        | 2 (3,4%)   | 3 (5,2%)             | 4 (6,9%)   |
| Otras localizaciones   | 40 (69%)         | 11 (19%)   | 22 (37,9%)           | 29 (50%)   | 36 (62,1%)      | 15 (25,9%) | 31 (53,4%)           | 20 (34,5%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,002*         |            | p=0,688              |            | p=1             |            | p=0,432              |            |

**Tabla 14.-** Resultados de la expresión de los factores de la familia del VEGF en muestra tumoral, según la localización del tumor.

<sup>†</sup> LSD.- Lóbulo superior derecho; LMD.- Lóbulo medio del pulmón derecho; LID.- Lóbulo inferior derecho; LSI.- Lóbulo superior izquierdo; LII.- Lóbulo inferior izquierdo.

#### 4.1.2.2.1.2 Expresión en células tumorales según la localización del tumor

Respecto a la localización del tumor, sólo la expresión de los factores VEGF-A y VEGF-B mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , Fisher) (tabla 14).

Todos los tumores (100%,  $n=9$ ) localizados en el lóbulo inferior del pulmón derecho expresaban VEGF-A, expresión que sólo se detectó en 32 (65,3%) de los 49 tumores procedentes de otras localizaciones.

VEGF-B se expresaba en las muestras de 7 (77,8%) de los 9 pacientes que presentaron la masa tumoral en el lóbulo inferior del pulmón derecho, mientras que se expresaba en las muestras de 17 (34,7%) de los 49 pacientes que presentaron el tumor en otras localizaciones.

VEGF-A no se expresaba en las muestras de 6 (85,7%) de los 7 pacientes que presentaron la masa tumoral en el lóbulo inferior del pulmón izquierdo, mientras que la ausencia de expresión de VEGF-A en los tumores procedentes de otras localizaciones se constató en 11 (21,6%) de los 51 casos.

Al estudiar las diferencias en los niveles de expresión de VEGF-A, encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis) entre las medias de expresión de las diferentes localizaciones de los tumores (tabla 15).

| Factores y Receptores | LSD <sup>‡</sup> | LMD       | LID       | LSI       | LII       | p-valor (Kruskal-Wallis) |
|-----------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|
| VEGF-A                | 1,10±1,13        | 1,40±1,54 | 1,56±0,72 | 1,44±1,03 | 0,29±0,75 | p=0,042*                 |
| VEGF-B                | 0,52±0,81        | 0,40±0,54 | 1,33±1,00 | 0,56±1,03 | 0,29±0,48 | p=0,107                  |
| VEGF-C                | 1,20±1,00        | 1,00±1,41 | 0,89±0,60 | 1,31±1,30 | 1,00±1,00 | p=0,872                  |
| VEGF-D                | 0,71±0,78        | 0,60±0,54 | 1,44±1,13 | 0,94±0,92 | 0,43±0,53 | p=0,271                  |
| VEGFR1                | 1,29±1,05        | 1,20±1,09 | 2,22±0,97 | 1,56±1,15 | 1,00±0,81 | p=0,175                  |
| VEGFR2                | 1,71±1,00        | 1,20±0,83 | 1,89±1,45 | 1,63±0,88 | 1,14±0,90 | p=0,482                  |
| VEGFR3                | 1,43±0,74        | 0,80±0,83 | 1,56±1,33 | 1,44±0,96 | 1,00±1,15 | p=0,51                   |

**Tabla 15.-** Medias de la expresión de los distintos factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral entre las distintas localizaciones tumorales.

<sup>‡</sup>LSD.- Lóbulo superior derecho; LMD.- Lóbulo medio del pulmón derecho; LID.- Lóbulo inferior derecho; LSI.- Lóbulo superior izquierdo; LII.- Lóbulo inferior izquierdo.

| Localización del tumor | VEGFR1     |            | VEGFR2     |           | VEGFR3     |            |
|------------------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|
|                        | Si         | No         | Si         | No        | Si         | No         |
| LSD <sup>‡</sup>       | 15 (25,9%) | 6 (10,3%)  | 18 (31%)   | 3 (5,2%)  | 20 (34,5%) | 1 (1,7%)   |
| Otras localizaciones   | 31 (53,4%) | 6 (10,3%)  | 31 (53,4%) | 6 (10,3%) | 27 (46,6%) | 10 (17,2%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,32     |            | p=1        |           | p=0,04*    |            |
| LMD                    | 4 (6,9%)   | 1 (1,7%)   | 4 (6,9%)   | 1 (1,7%)  | 3 (5,2%)   | 2 (3,4%)   |
| Otras localizaciones   | 42 (72,4%) | 11 (19%)   | 45 (77,6%) | 8 (13,8%) | 44 (75,9%) | 9 (15,5%)  |
| p-valor (Fisher)       | p=1        |            | p=1        |           | p=0,237    |            |
| LID                    | 9 (15,5%)  | 0          | 6 (10,3%)  | 3 (5,2%)  | 6 (10,3%)  | 3 (5,2%)   |
| Otras localizaciones   | 37 (63,8%) | 12 (20,7%) | 43 (74,1%) | 6 (10,3%) | 41 (70,7%) | 8 (13,8%)  |
| p-valor (Fisher)       | p=0,181    |            | p=0,136    |           | p=0,35     |            |
| LSI                    | 13 (22,4%) | 3 (5,2%)   | 15 (25,9%) | 1 (1,7%)  | 14 (24,1%) | 2 (3,4%)   |
| Otras localizaciones   | 33 (56,9%) | 9 (15,5%)  | 34 (58,6%) | 8 (13,8%) | 33 (56,9%) | 9 (15,5%)  |
| p-valor (Fisher)       | p=1        |            | p=0,42     |           | p=0,71     |            |
| LII                    | 5 (8,6%)   | 2 (3,4%)   | 6 (10,3%)  | 1 (1,7%)  | 4 (6,9%)   | 3 (5,2%)   |
| Otras localizaciones   | 41 (70,7%) | 10 (17,2%) | 43 (74,1%) | 8 (13,8%) | 43 (74,1%) | 8 (13,8%)  |
| p-valor (Fisher)       | p=0,626    |            | p=1        |           | p=0,117    |            |

**Tabla 16.-** Resultados de la expresión de los receptores para los factores de la familia del VEGF en célula tumoral, según la localización del tumor.

<sup>‡</sup>LSD.- Lóbulo superior derecho; LMD.- Lóbulo medio del pulmón derecho; LID.- Lóbulo inferior derecho; LSI.- Lóbulo superior izquierdo; LII.- Lóbulo inferior izquierdo.



La expresión de los receptores según la localización del tumor resultó ser estadísticamente significativa sólo para VEGFR3 en el lóbulo superior del pulmón derecho ( $p < 0,05$ , Fisher). Un solo paciente (4,8%) con tumor localizado en el lóbulo superior derecho no mostró expresión de VEGFR3, respecto al resto de los 20 pacientes (95,2%) con tumor localizado en el lóbulo superior del pulmón derecho que presentaron expresión de VEGFR3 (tabla 16).

Los niveles de expresión no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los receptores estudiados (tabla 15).

#### 4.1.2.2.1.3 Expresión en células tumorales según el tipo histológico

El análisis de la expresión según el tipo histológico, mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) para VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D, entre los pacientes con tumores del tipo epidermoide (tabla 17 y figuras 34 y 35).

Para los tumores de tipo adenocarcinoma, epidermoide y células pequeñas se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los receptores VEGFR1 y VEGFR3. En los tumores de tipo epidermoide y células pequeñas se hallaron diferencias estadísticamente significativas para la expresión de VEGFR2 ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (tabla 17 y figuras 36 y 37).

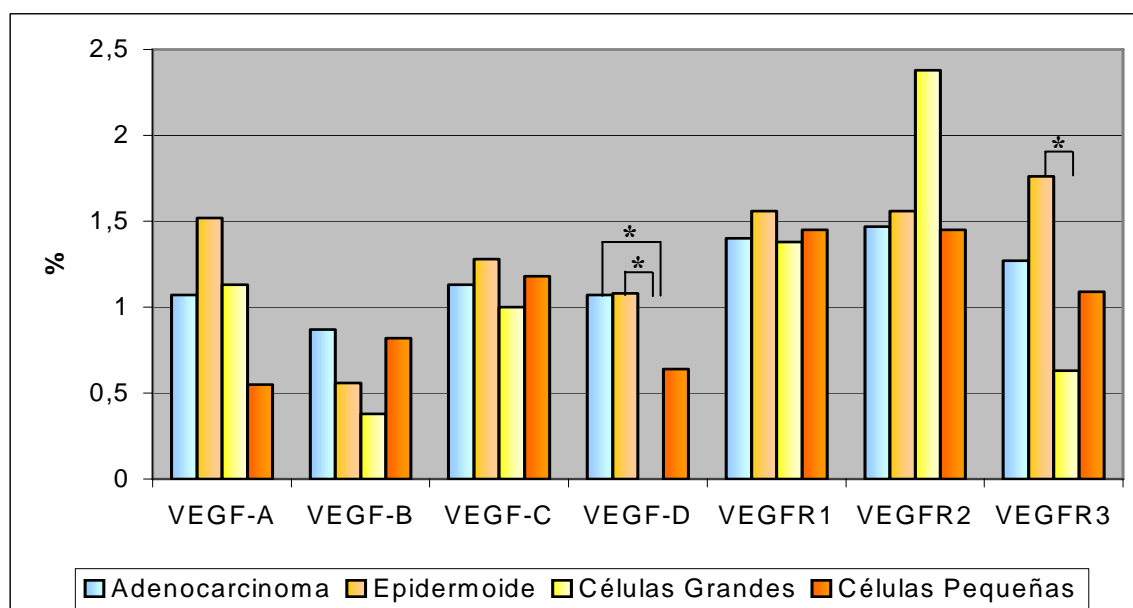
El estudio de los niveles de expresión mostró diferencias estadísticamente significativas sólo para VEGF-D ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis) entre los distintos tipos histológicos (tabla 18 y figura 12). Al realizar el análisis de la expresión por pares mediante el test de la U de Mann-Whitney, encontramos que esta diferencia se debe al distinto nivel de expresión entre las muestras de los adenocarcinomas y los de células grandes ( $p = 0,008$ ) y, entre los tumores epidermoides y los de células grandes ( $p = 0,001$ ).

| Factores y receptores familia VEGF |                      | Adenocarcinoma | Epidermoide | Células Grandes | Células Pequeñas |
|------------------------------------|----------------------|----------------|-------------|-----------------|------------------|
| VEGF-A                             | Si                   | 11 (73,3%)     | 22 (88%)    | 4 (50%)         | 4 (36,4%)        |
|                                    | No                   | 4 (26,7%)      | 3 (12%)     | 4 (50%)         | 7 (63,6%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,071        | p=0,0001*   | p=1             | p=0,366          |
| VEGF-B                             | Si                   | 7 (46,7%)      | 11 (44%)    | 3 (37,5%)       | 4 (36,4%)        |
|                                    | No                   | 8 (53,3%)      | 14 (56%)    | 5 (62,5%)       | 7 (63,6%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,796        | p=0,549     | p=0,48          | p=0,366          |
| VEGF-C                             | Si                   | 9 (60%)        | 19 (76%)    | 6 (75%)         | 8 (72,7%)        |
|                                    | No                   | 6 (40%)        | 6 (24%)     | 2 (25%)         | 3 (27,3%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,439        | p=0,009*    | p=0,157         | p=0,132          |
| VEGF-D                             | Si                   | 10 (66,7%)     | 19 (76%)    | 0               | 6 (54,5%)        |
|                                    | No                   | 5 (33,3%)      | 6 (24%)     | 8 (100%)        | 5 (45,5%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,197        | p=0,009*    |                 | p=0,763          |
| VEGFR1                             | Si                   | 12 (80%)       | 20 (80%)    | 6 (75%)         | 9 (81,8%)        |
|                                    | No                   | 3 (20%)        | 5 (20%)     | 2 (25%)         | 2 (18,2%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,02*        | p=0,003*    | p=0,157         | p=0,035*         |
| VEGFR2                             | Si                   | 11 (73,3%)     | 22 (88%)    | 8 (100%)        | 9 (81,8%)        |
|                                    | No                   | 4 (26,7%)      | 3 (12%)     | 0               | 2 (18,2%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,071        | p=0,0001*   |                 | p=0,035*         |
| VEGFR3                             | Si                   | 12 (80%)       | 23 (92%)    | 3 (37,5%)       | 8 (72,7%)        |
|                                    | No                   | 3 (20%)        | 2 (8%)      | 5 (62,5%)       | 3 (27,3%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,02*        | p=0,00002*  | p=0,48          | p=0,132          |

**Tabla 17.-** Resultados de la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral, según el tipo histológico.

| Factores y receptores<br>Familia VEGF |          | Adenocarcinoma | Epidermoide | Células<br>Grandes | Células<br>Pequeñas |
|---------------------------------------|----------|----------------|-------------|--------------------|---------------------|
| VEGF-A                                | Nula     | 4 (26,7%)      | 3 (12%)     | 4 (50%)            | 7 (63,6%)           |
|                                       | Baja     | 7 (46,7%)      | 11 (44%)    | 0                  | 3 (27,3%)           |
|                                       | Moderada | 3 (20%)        | 6 (24%)     | 3 (37,5%)          | 0                   |
|                                       | Alta     | 1 (6,7%)       | 5 (20%)     | 1 (12,5%)          | 1 (9,1%)            |
|                                       | Media    | 1,07±0,88      | 1,52±0,96   | 1,13±1,24          | 0,55±0,93           |
| p-valor (ANOVA)                       |          | p=0,06         |             |                    |                     |
| VEGF-B                                | Nula     | 8 (53,3%)      | 14 (56%)    | 5 (62,5%)          | 7 (63,6%)           |
|                                       | Baja     | 3 (20%)        | 9 (36%)     | 3 (37,5%)          | 1 (9,1%)            |
|                                       | Moderada | 2 (13,3%)      | 1 (4%)      | 0                  | 2 (18,2%)           |
|                                       | Alta     | 2 (13,3%)      | 1 (4%)      | 0                  | 1 (9,1%)            |
|                                       | Media    | 0,87±1,12      | 0,56±0,76   | 0,38±0,51          | 0,82±1,25           |
| p-valor (Kruskal-Wallis)              |          | p=0,862        |             |                    |                     |
| VEGF-C                                | Nula     | 6 (40%)        | 6 (24%)     | 2 (25%)            | 3 (27,3%)           |
|                                       | Baja     | 4 (26,7%)      | 11 (44%)    | 5 (62,5%)          | 5 (45,5%)           |
|                                       | Moderada | 2 (13,3%)      | 3 (12%)     | 0                  | 1 (9,1%)            |
|                                       | Alta     | 3 (20%)        | 5 (20%)     | 1 (12,5%)          | 2 (18,2%)           |
|                                       | Media    | 1,13±1,18      | 1,28±1,06   | 1,00±0,92          | 1,18±1,07           |
| p-valor (ANOVA)                       |          | p=0,927        |             |                    |                     |
| VEGF-D                                | Nula     | 5 (33,3%)      | 6 (24%)     | 8 (100%)           | 5 (45,5%)           |
|                                       | Baja     | 6 (40%)        | 12 (48%)    | 0                  | 5 (45,5%)           |
|                                       | Moderada | 2 (13,3%)      | 6 (24%)     | 0                  | 1 (9,1%)            |
|                                       | Alta     | 2 (13,3%)      | 1 (4%)      | 0                  | 0                   |
|                                       | Media    | 1,07±1,03      | 1,08±0,81   | 0,00±0,00          | 0,64±0,67           |
| p-valor (Kruskal-Wallis)              |          | p=0,004*       |             |                    |                     |
| VEGFR1                                | Nula     | 3 (20%)        | 5 (20%)     | 2 (25%)            | 2 (18,2%)           |
|                                       | Baja     | 7 (46,7%)      | 8 (32%)     | 3 (37,5%)          | 3 (27,3%)           |
|                                       | Moderada | 1 (6,7%)       | 5 (20%)     | 1 (12,5%)          | 5 (45,5%)           |
|                                       | Alta     | 4 (26,7%)      | 7 (28%)     | 2 (25%)            | 1 (9,1%)            |
|                                       | Media    | 1,40±1,12      | 1,56±1,12   | 1,38±1,18          | 1,45±0,93           |
| p-valor (ANOVA)                       |          | p=0,962        |             |                    |                     |
| VEGFR2                                | Nula     | 4 (26,7%)      | 3 (12%)     | 0                  | 2 (18,2%)           |
|                                       | Baja     | 4 (26,7%)      | 10 (40%)    | 1 (12,5%)          | 4 (36,4%)           |
|                                       | Moderada | 3 (20%)        | 7 (28%)     | 3 (37,5%)          | 3 (27,3%)           |
|                                       | Alta     | 4 (26,7%)      | 5 (20%)     | 4 (50%)            | 2 (18,2%)           |
|                                       | Media    | 1,47±1,18      | 1,56±0,96   | 2,38±0,74          | 1,45±1,03           |
| p-valor (ANOVA)                       |          | p=0,173        |             |                    |                     |
| VEGFR3                                | Nula     | 3 (20%)        | 2 (8%)      | 3 (37,5%)          | 3 (27,3%)           |
|                                       | Baja     | 8 (53,3%)      | 7 (28%)     | 5 (62,5%)          | 5 (45,5%)           |
|                                       | Moderada | 1 (6,7%)       | 11 (44%)    | 0                  | 2 (18,2%)           |
|                                       | Alta     | 3 (20%)        | 5 (20%)     | 0                  | 1 (9,1%)            |
|                                       | Media    | 1,27±1,03      | 1,76±0,87   | 0,63±0,51          | 1,09±0,94           |
| p-valor (ANOVA)                       |          | p=0,015*       |             |                    |                     |

**Tabla 18.-** Niveles de expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral, según el tipo histológico.



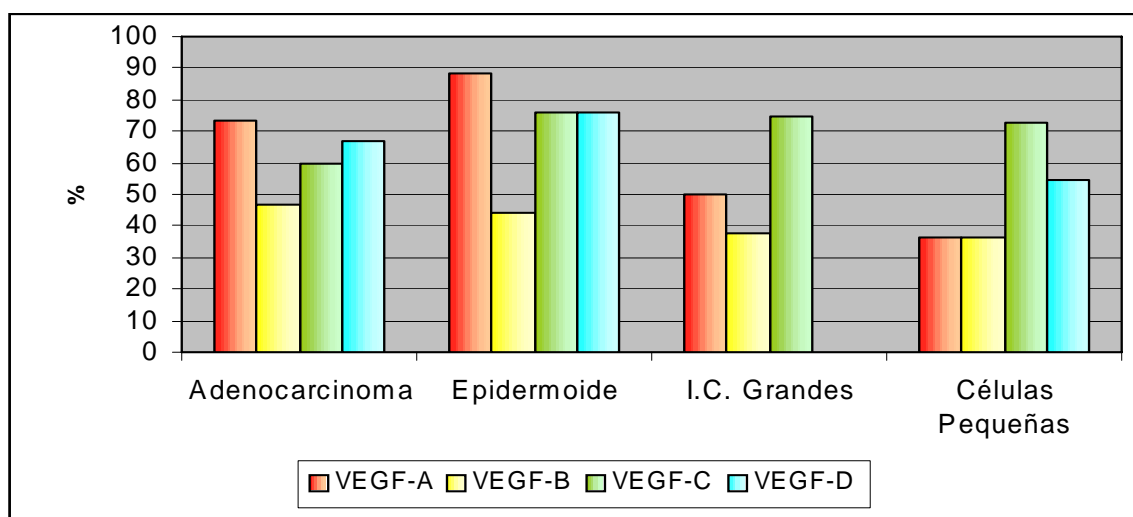
**Figura 12.-** Expresión media de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral, según tipo histológico.

\*  $p < 0,05$

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de VEGFR3 ( $p < 0,05$ , ANOVA) entre los distintos tipos histológicos (tabla 18 y figura 12). El contraste *a posteriori* reveló que esta diferencia se debía a los distintos niveles de expresión entre las muestras de tumores epidermoides y tumores de células grandes ( $p = 0,018$ ).

También se observó que un mayor porcentaje de tumores no microcíticos expresaban VEGF-A respecto a los tumores del tipo células pequeñas, mientras que los tumores tipo células grandes no expresaron en ningún caso VEGF-D y todos expresaron VEGFR2.

Los pacientes con tumores del tipo células pequeñas expresaron en mayor porcentaje los factores VEGF-C y VEGF-D, relacionados con la linfangiogenesis, respecto a los factores VEGF-A y VEGF-B, relacionados con la angiogenesis (figura 13).



**Figura 13.-** Expresión de los factores de la familia del VEGF en célula tumoral, según tipo histológico.

Respecto a los niveles de expresión de los factores de la familia del VEGF y sus receptores, se observó que en los carcinomas de células pequeñas VEGF-A y VEGF-D se expresaban en menor medida, respecto a los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas, y que los carcinomas epidermoides expresaban en mayor medida VEGFR3, respecto a los carcinomas de tipo células pequeñas. También se observó que los carcinomas de células grandes expresaban en mayor medida VEGFR2, respecto al resto de las estirpes histológicas (figura 12).

#### 4.1.2.2.1.4 Expresión en células tumorales según la estadificación

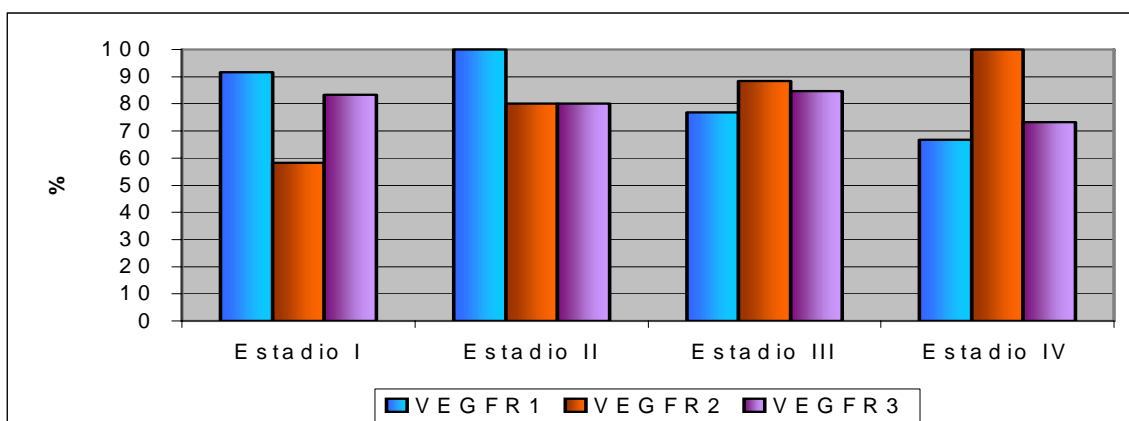
La expresión de los factores de la familia del VEGF, respecto a la estadificación TNM, resultó ser estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) solamente para VEGF-A en el estadio III. Además, se observó un mayor porcentaje de tumores que expresaban VEGF-D en los estadios más avanzados (III y IV), respecto a las muestras de los pacientes del estadio I (tabla 19).

Los receptores mostraron diferencias estadísticamente significativas en su expresión para VEGFR1 y VEGFR3, en los estadios I y III, y para VEGFR2 en el estadio III ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ). En el estadio más bajo (estadio I) VEGFR1 se expresaba en mayor número de muestras, respecto a VEGFR2; mientras que, en los estadios más altos (estadios III y IV) VEGFR2 se expresaba en mayor número de muestras respecto a VEGFR1 (tabla 19 y figura 14).

| Factores y receptores familia VEGF |                      | Estadio I  | Estadio II | Estadio III | Estadio IV |
|------------------------------------|----------------------|------------|------------|-------------|------------|
| VEGF-A                             | Si                   | 8 (66,7%)  | 4 (80%)    | 20 (76,9%)  | 8 (53,3%)  |
|                                    | No                   | 4 (33,3%)  | 1 (20%)    | 6 (23,1%)   | 7 (46,7%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,248    | ‡          | p=0,006*    | p=0,796    |
| VEGF-B                             | Si                   | 5 (41,7%)  | 3 (60%)    | 8 (30,8%)   | 8 (53,3%)  |
|                                    | No                   | 7 (58,3%)  | 2 (40%)    | 18 (69,2%)  | 7 (46,7%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,564    | ‡          | p=0,05      | p=0,796    |
| VEGF-C                             | Si                   | 8 (66,7%)  | 4 (80%)    | 18 (69,2%)  | 11 (73,3%) |
|                                    | No                   | 4 (33,3%)  | 1 (20%)    | 8 (30,8%)   | 4 (26,7%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,248    | ‡          | p=0,05      | p=0,071    |
| VEGF-D                             | Si                   | 5 (41,7%)  | 4 (80%)    | 17 (65,4%)  | 8 (53,3%)  |
|                                    | No                   | 7 (58,3%)  | 1 (20%)    | 9 (34,6%)   | 7 (46,7%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,564    | ‡          | p=0,117     | p=0,796    |
| VEGFR1                             | Si                   | 11 (91,7%) | 5 (100%)   | 20 (76,9%)  | 10 (66,7%) |
|                                    | No                   | 1 (8,3%)   | 0          | 6 (23,1%)   | 5 (33,3%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,004*   | ‡          | p=0,006*    | p=0,197    |
| VEGFR2                             | Si                   | 7 (58,3%)  | 4 (80%)    | 23 (88,5%)  | 15 (100%)  |
|                                    | No                   | 5 (41,7%)  | 1 (20%)    | 3 (11,5%)   | 0          |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,564    | ‡          | p=0,00008*  |            |
| VEGFR3                             | Si                   | 10 (83,3%) | 4 (80%)    | 22 (84,6%)  | 11 (73,3%) |
|                                    | No                   | 2 (16,7%)  | 1 (20%)    | 4 (15,4%)   | 4 (26,7%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,021*   | ‡          | p=0,0004*   | p=0,071    |

**Tabla 19.-** Resultados de la expresión de factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral, según estadio.

‡ No se pudo aplicar test estadístico por el escaso número de pacientes.

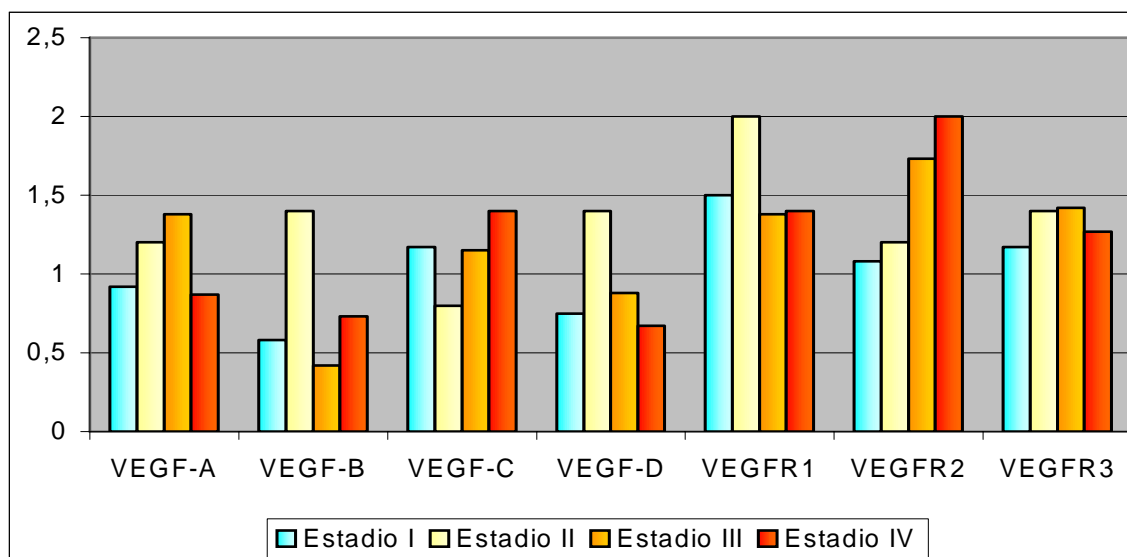


**Figura 14.-** Expresión de los receptores para los factores de la familia del VEGF en célula tumoral, según estadio.

| Factores y receptores<br>Familia VEGF |                             | Estadio I | Estadio II | Estadio III | Estadio IV |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------|------------|-------------|------------|
| VEGF-A                                | Nula                        | 4 (33,3%) | 1 (20%)    | 6 (23,1%)   | 7 (46,7%)  |
|                                       | Baja                        | 5 (41,7%) | 2 (40%)    | 11 (42,3%)  | 3 (20%)    |
|                                       | Moderada                    | 3 (25%)   | 2 (40%)    | 2 (7,7%)    | 5 (33,3%)  |
|                                       | Alta                        | 0         | 0          | 7 (26,9%)   | 0          |
|                                       | Media                       | 0,92±0,79 | 1,20±0,83  | 1,38±1,13   | 0,87±0,91  |
|                                       | p-valor<br>(Kruskal-Wallis) | p=0,473   |            |             |            |
| VEGF-B                                | Nula                        | 7 (58,3%) | 2 (40%)    | 18 (69,2%)  | 7 (46,7%)  |
|                                       | Baja                        | 3 (25%)   | 1 (20%)    | 6 (23,1%)   | 6 (40%)    |
|                                       | Moderada                    | 2 (16,7%) | 0          | 1 (3,8%)    | 1 (6,7%)   |
|                                       | Alta                        | 0         | 2 (40%)    | 1 (3,8%)    | 1 (6,7%)   |
|                                       | Media                       | 0,58±0,79 | 1,40±1,51  | 0,42±0,75   | 0,73±0,88  |
|                                       | p-valor<br>(Kruskal-Wallis) | p=0,309   |            |             |            |
| VEGF-C                                | Nula                        | 4 (33,3%) | 1 (20%)    | 8 (30,8%)   | 4 (26,7%)  |
|                                       | Baja                        | 5 (41,7%) | 4 (80%)    | 10 (38,5%)  | 5 (33,3%)  |
|                                       | Moderada                    | 0         | 0          | 4 (15,4%)   | 2 (13,3%)  |
|                                       | Alta                        | 3 (25%)   | 0          | 4 (15,4%)   | 4 (26,7%)  |
|                                       | Media                       | 1,17±1,19 | 0,80±0,44  | 1,15±1,04   | 1,40±1,18  |
|                                       | p-valor<br>(Kruskal-Wallis) | p=0,838   |            |             |            |
| VEGF-D                                | Nula                        | 7 (58,3%) | 1 (20%)    | 9 (34,6%)   | 7 (46,7%)  |
|                                       | Baja                        | 2 (16,7%) | 2 (40%)    | 12 (46,2%)  | 6 (40%)    |
|                                       | Moderada                    | 2 (16,7%) | 1 (20%)    | 4 (15,4%)   | 2 (13,3%)  |
|                                       | Alta                        | 1 (8,3%)  | 1 (20%)    | 1 (3,8%)    | 0          |
|                                       | Media                       | 0,75±1,05 | 1,40±1,14  | 0,88±0,81   | 0,67±0,72  |
|                                       | p-valor<br>(Kruskal-Wallis) | p=0,458   |            |             |            |
| VEGFR1                                | Nula                        | 1 (8,3%)  | 0          | 6 (23,1%)   | 5 (33,3%)  |
|                                       | Baja                        | 7 (58,3%) | 2 (40%)    | 9 (34,6%)   | 3 (20%)    |
|                                       | Moderada                    | 1 (8,3%)  | 1 (20%)    | 6 (23,1%)   | 3 (20%)    |
|                                       | Alta                        | 3 (25%)   | 2 (40%)    | 5 (19,2%)   | 4 (26,7%)  |
|                                       | Media                       | 1,50±1,00 | 2,00±1,00  | 1,38±1,06   | 1,40±1,24  |
|                                       | p-valor (ANOVA)             | p=0,707   |            |             |            |
| VEGFR2                                | Nula                        | 5 (41,7%) | 1 (20%)    | 3 (11,5%)   | 0          |
|                                       | Baja                        | 3 (25%)   | 3 (60%)    | 8 (30,8%)   | 5 (33,3%)  |
|                                       | Moderada                    | 2 (16,7%) | 0          | 8 (30,8%)   | 5 (33,3%)  |
|                                       | Alta                        | 2 (16,7%) | 1 (20%)    | 7 (26,9%)   | 5 (33,3%)  |
|                                       | Media                       | 1,08±1,16 | 1,20±1,09  | 1,73±1,00   | 2,00±0,84  |
|                                       | p-valor (ANOVA)             | p=0,094   |            |             |            |
| VEGFR3                                | Nula                        | 2 (16,7%) | 1 (20%)    | 4 (15,4%)   | 4 (26,7%)  |
|                                       | Baja                        | 7 (58,3%) | 1 (20%)    | 11 (42,3%)  | 6 (40%)    |
|                                       | Moderada                    | 2 (16,7%) | 3 (60%)    | 7 (26,9%)   | 2 (13,3%)  |
|                                       | Alta                        | 1 (8,3%)  | 0          | 4 (15,4%)   | 3 (20%)    |
|                                       | Media                       | 1,17±0,83 | 1,40±0,89  | 1,42±0,94   | 1,27±1,10  |
|                                       | p-valor<br>(Kruskal-Wallis) | p=0,823   |            |             |            |

**Tabla 20.-** Estudio de los niveles de expresión en célula tumoral, según el estadio.

El estudio de los niveles de expresión según el estadio no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los distintos estadios (tabla 20). Sin embargo, aunque no se han encontrado diferencias significativas, se puede observar que los niveles de expresión para VEGFR2 van aumentando, según avanzamos en el estadio (figura 15).



**Figura 15.-** Expresión media de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral, según el estadio.

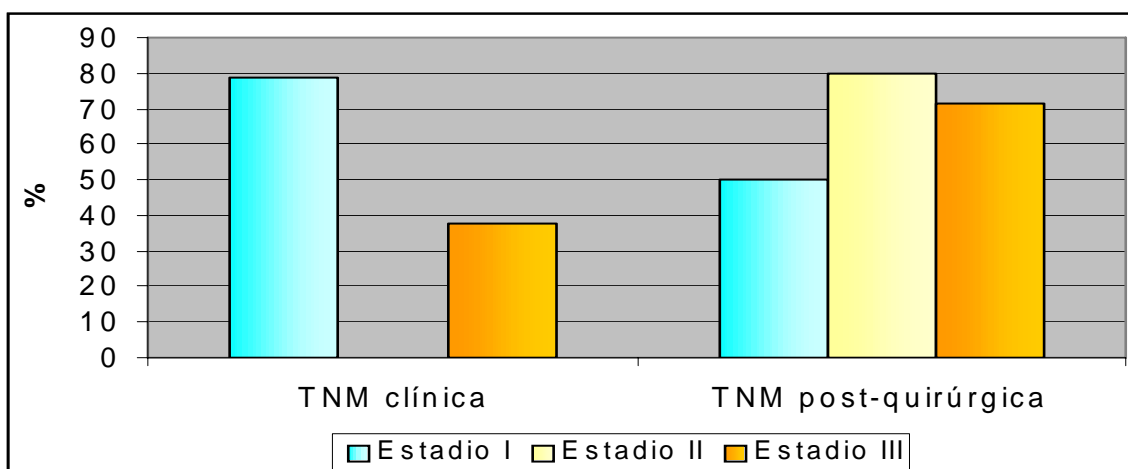
Atendiendo a la clasificación TNM post-quirúrgica, los pacientes con estadios II y III expresan con mayor frecuencia VEGF-D que los pacientes clasificados como estadios I. Este hecho se reproduce de forma inversa cuando consideramos la clasificación TNM clínica (tabla 21 y figura 16). Respecto a los niveles de expresión lo mismo ocurre para VEGF-D entre los estadios I y III (tabla 22, figura 17 y figura 18). Esto ocurre muy probablemente porque en el estadio I clínico estén incluidos pacientes que realmente presentan enfermedad avanzada.

Efectivamente, una vez realizado el estudio anatomopatológico de las piezas quirúrgicas, 6 pacientes clasificados según la TNM clínica como estadios I se reestadiaron en la TNM post-quirúrgica; 3 como estadios II y 3 como estadios III, presentando todos ellos expresión para VEGF-D con niveles de expresión entre 1 y 3. Además, 4 pacientes clasificados según la TNM clínica como estadios III se reestadiaron en la TNM post-quirúrgica: 2 como estadios I y 2 como estadios II, presentando sólo 1 expresión para VEGF-D, y que se reestadio como estadio II.



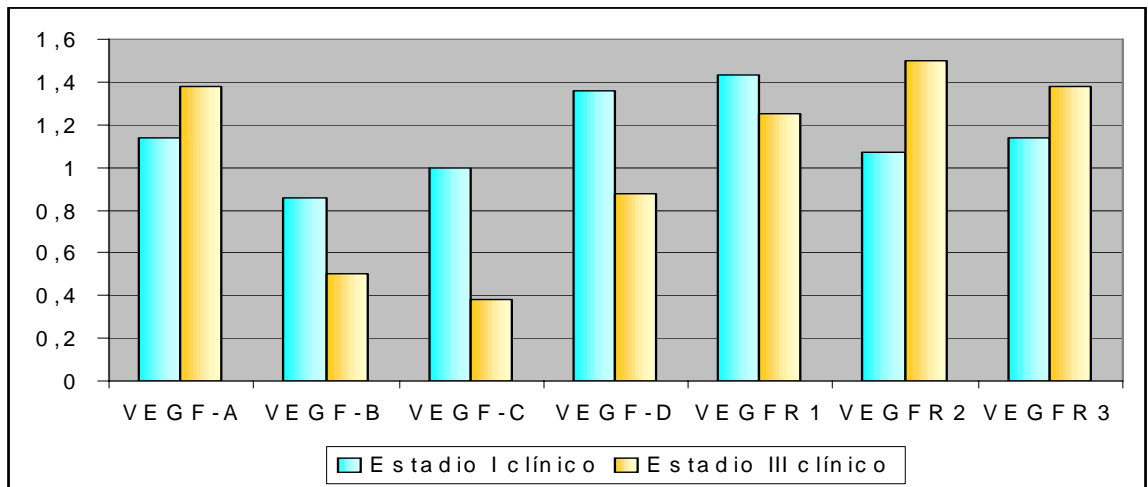
| Factores Familia VEGF |                     | Estadio I     | Estadio II | Estadio III  |
|-----------------------|---------------------|---------------|------------|--------------|
| VEGF-A                | TNM clinica         | 10/14 (71,4%) | 0          | 6/8 (75%)    |
|                       | TNM post-quirúrgica | 7/10 (70%)    | 4/5 (80%)  | 5/7 (71,4%)  |
| VEGF-B                | TNM clinica         | 7/14 (50%)    | 0          | 2/8 (25%)    |
|                       | TNM post-quirúrgica | 4/10 (40%)    | 3/5 (60%)  | 2/7 (28,6%)  |
| VEGF-C                | TNM clinica         | 10/14 (71,4%) | 0          | 3/8 (37,5%)  |
|                       | TNM post-quirúrgica | 6/10 (60%)    | 4/5 (80%)  | 3/7 (42,9%)  |
| VEGF-D                | TNM clinica         | 11/14 (78,6%) | 0          | 3/8 (37,5 %) |
|                       | TNM post-quirúrgica | 5/10 (50%)    | 4/5 (80%)  | 5/7 (71,4%)  |
| VEGFR1                | TNM clinica         | 12/14 (85,7%) | 0          | 6/8 (75%)    |
|                       | TNM post-quirúrgica | 9/10 (90%)    | 5/5 (100%) | 4/7 (57,1%)  |
| VEGFR2                | TNM clinica         | 9/14 (64,3%)  | 0          | 7/8 (87,5%)  |
|                       | TNM post-quirúrgica | 5/10 (50%)    | 4/5 (80%)  | 7/7 (100%)   |
| VEGFR3                | TNM clinica         | 11/14 (78,6%) | 0          | 7/8 (87,5%)  |
|                       | TNM post-quirúrgica | 8/10 (80%)    | 4/5 (80%)  | 6/7 (85,7%)  |

**Tabla 21.-** Expresión de factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral, según TNM clínica y post-quirúrgica de los pacientes sometidos a cirugía.

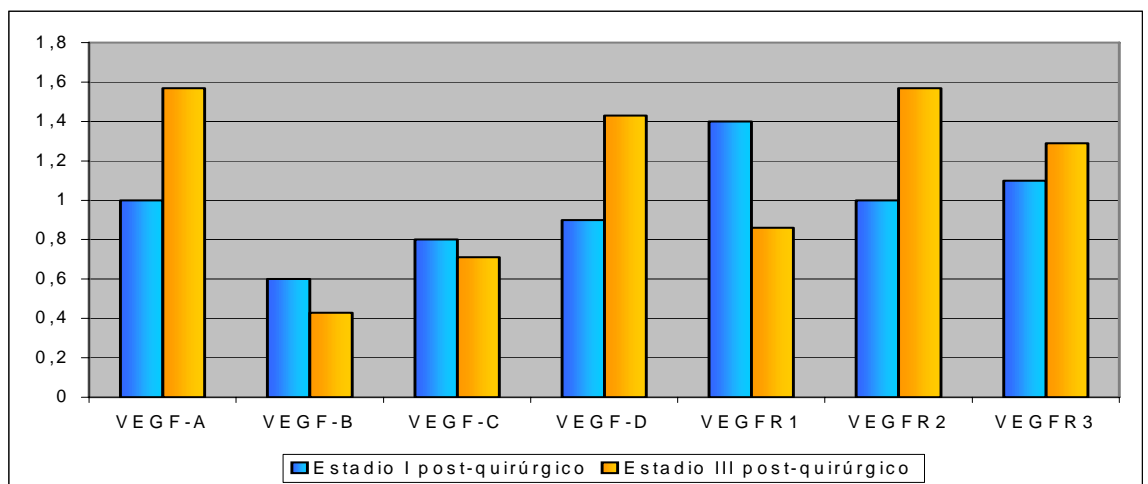


**Figura 16.-** Expresión de VEGF-D en células tumorales de pacientes quirúrgicos, según TNM clínica y TNM post-quirúrgica.

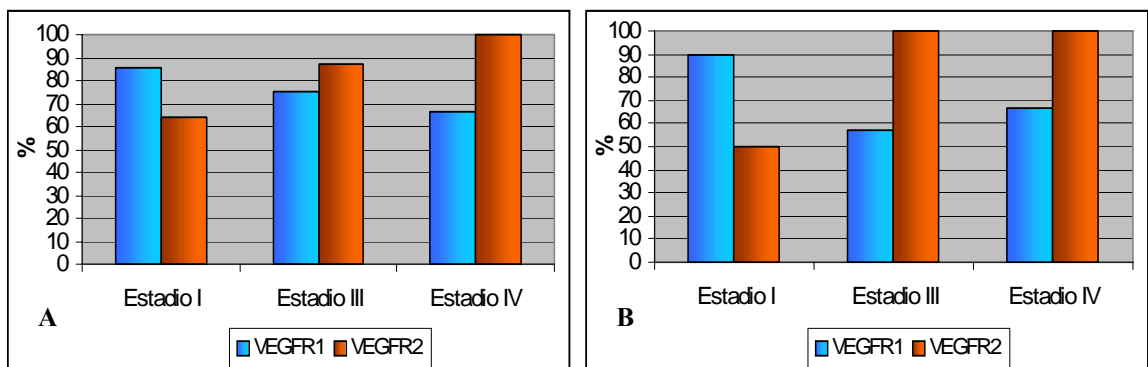
El análisis de la expresión de los receptores en los pacientes quirúrgicos revela, en ambas clasificaciones TNM, una mayor tendencia a no expresar VEGFR1 y sí expresar VEGFR2 a medida que progresamos hacia estadios más avanzados de la enfermedad, siendo esta diferencia más notoria en la TNM post-quirúrgica, respecto a la TNM clínica (tabla 22 y figura 19).



**Figura 17.-** Niveles de expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral de los pacientes quirúrgicos con estadios I y III clínicos.



**Figura 18.-** Niveles de expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral de los pacientes quirúrgicos con estadios I y III post-quirúrgicos.



**Figura 19.-** Expresión VEGFR1 y VEGFR2 en célula tumoral de los pacientes quirúrgicos. A.- TNM clínica; B.- TNM post-quirúrgica.

| Factores y Receptores Familia VEGF |          | Estadio I   |                     | Estadio III |                     |
|------------------------------------|----------|-------------|---------------------|-------------|---------------------|
|                                    |          | TNM clínica | TNM post-quirúrgica | TNM clínica | TNM post-quirúrgica |
| VEGF-A                             | Nula     | 4 (28,6%)   | 3 (30%)             | 2 (25%)     | 2 (28,6%)           |
|                                    | Baja     | 5 (35,7%)   | 4 (40%)             | 3 (37,5%)   | 2 (28,6%)           |
|                                    | Moderada | 4 (28,6%)   | 3 (30%)             | 1 (12,5%)   | 0                   |
|                                    | Alta     | 1 (7,1%)    | 0                   | 2 (25%)     | 3 (42,9%)           |
|                                    | Media    | 1,14±0,94   | 1,00±0,81           | 1,38±1,18   | 1,57±1,39           |
| VEGF-B                             | Nula     | 7 (50%)     | 6 (60%)             | 6 (75%)     | 5 (71,4%)           |
|                                    | Baja     | 3 (21,4%)   | 2 (20%)             | 1 (12,5%)   | 1 (14,3%)           |
|                                    | Moderada | 3 (21,4%)   | 2 (20%)             | 0           | 1 (14,3%)           |
|                                    | Alta     | 1 (7,1%)    | 0                   | 1 (12,5%)   | 0                   |
|                                    | Media    | 0,86±1,02   | 0,60±0,84           | 0,50±1,06   | 0,43±0,78           |
| VEGF-C                             | Nula     | 4 (28,6%)   | 4 (40%)             | 5 (62,5%)   | 4 (57,1%)           |
|                                    | Baja     | 7 (50%)     | 5 (50%)             | 3 (37,5%)   | 1 (14,3%)           |
|                                    | Moderada | 2 (14,3%)   | 0                   | 0           | 2 (28,6%)           |
|                                    | Alta     | 1 (7,1%)    | 1 (10%)             | 0           | 0                   |
|                                    | Media    | 1,00±0,87   | 0,80±0,91           | 0,38±0,51   | 0,71±0,95           |
| VEGF-D                             | Nula     | 3 (21,4%)   | 5 (50%)             | 5 (62,5%)   | 2 (28,6%)           |
|                                    | Baja     | 5 (35,7%)   | 2 (20%)             | 0           | 1 (14,3%)           |
|                                    | Moderada | 4 (28,6%)   | 2 (20%)             | 2 (25%)     | 3 (42,9%)           |
|                                    | Alta     | 2 (14,3%)   | 1 (10%)             | 1 (12,5%)   | 1 (14,3%)           |
|                                    | Media    | 1,36±1,00   | 0,90±1,10           | 0,88±1,24   | 1,43±1,13           |
| VEGFR1                             | Nula     | 2 (14,3%)   | 1 (10%)             | 2 (25%)     | 3 (42,9%)           |
|                                    | Baja     | 7 (50%)     | 6 (60%)             | 4 (50%)     | 3 (42,9%)           |
|                                    | Moderada | 2 (14,3%)   | 1 (10%)             | 0           | 0                   |
|                                    | Alta     | 3 (21,4%)   | 2 (20%)             | 2 (25%)     | 1 (14,3%)           |
|                                    | Media    | 1,43±1,01   | 1,40±0,96           | 1,25±1,16   | 0,86±1,06           |
| VEGFR2                             | Nula     | 5 (35,7%)   | 5 (50%)             | 1 (12,5%)   | 0                   |
|                                    | Baja     | 5 (35,7%)   | 2 (20%)             | 4 (50%)     | 4 (57,1%)           |
|                                    | Moderada | 2 (14,3%)   | 1 (10%)             | 1 (12,5%)   | 2 (28,6%)           |
|                                    | Alta     | 2 (14,3%)   | 2 (20%)             | 2 (25%)     | 1 (14,3%)           |
|                                    | Media    | 1,07±1,07   | 1,00±1,24           | 1,50±1,06   | 1,57±0,78           |
| VEGFR3                             | Nula     | 3 (21,4%)   | 2 (20%)             | 1 (12,5%)   | 1 (14,3%)           |
|                                    | Baja     | 7 (50%)     | 6 (60%)             | 3 (37,5%)   | 3 (42,9%)           |
|                                    | Moderada | 3 (21,4%)   | 1 (10%)             | 4 (50%)     | 3 (42,9%)           |
|                                    | Alta     | 1 (7,1%)    | 1 (10%)             | 0           | 0                   |
|                                    | Media    | 1,14±0,86   | 1,10±0,87           | 1,38±0,74   | 1,29±0,75           |

**Tabla 22.-** Niveles de expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral de los pacientes quirúrgicos, según su clasificación clínica y post-quirúrgica.

Finalmente, los pacientes con estadios III según la clasificación TNM post-quirúrgica expresaban en mayor cantidad VEGF-A, VEGF-D y VEGFR2, respecto a los pacientes con estadios I. De forma inversa, los pacientes en estadio I expresaban en mayor cantidad VEGFR1, respecto a los pacientes con estadios III (tabla 22 y figura 18).

#### 4.1.2.2.2 *Expresión en células endoteliales*

En el estudio de la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en el endotelio tumoral, 14 muestras no pudieron ser valoradas; 8 de VEGF-A, 2 de VEGFR1, 3 de VEGFR2 y 1 de VEGFR3.

La expresión en células endoteliales de alguno de los factores de la familia del VEGF se observó en 40 (70,1%) de 57 casos estudiados. Veintiocho tumores (54,9%) expresaron VEGF-A, 4 (6,8%) expresaron VEGF-B, 2 (3,4%) expresaron VEGF-C y 22 (37,3%) expresaron VEGF-D. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la expresión de VEGF-B y VEGF-C ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (tabla 23).

La expresión de alguno de los receptores para los factores de la familia del VEGF en la membrana y/o citosol de las células endoteliales, se encontró en 49 muestras (85,9%) de 57 casos. Veinticinco (43,9%) expresaron VEGFR1, 29 (51,8%) expresaron VEGFR2 y 15 (25,9%) expresaron VEGFR3. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas sólo para la expresión de VEGFR3 ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (tabla 23).

##### 4.1.2.2.2.1 Expresión en célula endotelial según la edad y el tamaño del tumor

Respecto a la edad de los pacientes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los factores y receptores de la familia del VEGF (tabla 23).

El análisis de la expresión respecto al tamaño del tumor mostró diferencias estadísticamente significativas sólo para VEGFR3 ( $p < 0,05$ , Fisher). Muestras de 11 pacientes (33,3%) con tumores menores o iguales a seis centímetros mostraron expresión para VEGFR3, mientras que sólo en 1 tumor mayor de seis centímetros (5,8%) se observó expresión para VEGFR3. Para el resto de los factores y receptores estudiados no se hallaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tamaño del tumor (tabla 23).

| Factores y Receptores |           | Expresión  |            | p-valor ( $\chi^2$ ) |
|-----------------------|-----------|------------|------------|----------------------|
|                       |           | Si         | No         |                      |
| VEGF-A                |           | 28 (54,9%) | 23 (45,1%) | p=0,484              |
| VEGF-B                |           | 4 (6,8%)   | 55 (93,2%) | p=0,00000000003*     |
| VEGF-C                |           | 2 (3,4%)   | 57 (96,6%) | p=0,000000000008*    |
| VEGF-D                |           | 22 (37,3%) | 37 (62,7%) | p=0,051              |
| VEGFR1                |           | 25 (43,9%) | 32 (56,1%) | p=0,354              |
| VEGFR2                |           | 29 (51,8%) | 27 (48,2%) | p=0,789              |
| VEGFR3                |           | 15 (25,9%) | 43 (74,1%) | p=0,0002*            |
| Edad                  |           | Expresión  |            | p-valor ( $\chi^2$ ) |
|                       |           | Si         | No         |                      |
| VEGF-A                | ≤ 67 años | 12 (23,5%) | 12 (23,5%) | p=0,703              |
|                       | > 67 años | 16 (31,4%) | 11 (21,6%) |                      |
| VEGF-B                | ≤ 67 años | 2 (3,4%)   | 25 (42,4%) | p=1 (Fisher)         |
|                       | > 67 años | 2 (3,4%)   | 30 (52,8%) |                      |
| VEGF-C                | ≤ 67 años | 1 (1,7%)   | 26 (44,1%) | p=1 (Fisher)         |
|                       | > 67 años | 1 (1,7%)   | 31 (52,5%) |                      |
| VEGF-D                | ≤ 67 años | 12 (20,3%) | 15 (25,4%) | p=0,439              |
|                       | > 67 años | 10 (16,9%) | 22 (37,3%) |                      |
| VEGFR1                | ≤ 67 años | 10 (17,5%) | 17 (29,8%) | p=0,473              |
|                       | > 67 años | 15 (26,3%) | 15 (26,3%) |                      |
| VEGFR2                | ≤ 67 años | 14 (25%)   | 13 (23,2%) | p=1                  |
|                       | > 67 años | 15 (26,8%) | 14 (25%)   |                      |
| VEGFR3                | ≤ 67 años | 10 (17,2%) | 17 (29,3%) | p=0,130              |
|                       | > 67 años | 5 (8,6%)   | 26 (44,8%) |                      |
| Tamaño                |           | Expresión  |            | p-valor ( $\chi^2$ ) |
|                       |           | Si         | No         |                      |
| VEGF-A                | ≤ 6 cm    | 19 (43,2%) | 10 (22,7%) | p=0,378              |
|                       | > 6 cm    | 7 (15,9%)  | 8 (18,2%)  |                      |
| VEGF-B                | ≤ 6 cm    | 4 (7,8%)   | 29 (56,9%) | p=0,284 (Fisher)     |
|                       | > 6 cm    | 0          | 18 (35,3%) |                      |
| VEGF-C                | ≤ 6 cm    | 2 (3,9%)   | 31 (60,8%) | p=0,534 (Fisher)     |
|                       | > 6 cm    | 0          | 18 (35,3%) |                      |
| VEGF-D                | ≤ 6 cm    | 14 (27,5%) | 19 (37,3%) | p=0,256              |
|                       | > 6 cm    | 4 (7,8%)   | 14 (27,5%) |                      |
| VEGFR1                | ≤ 6 cm    | 12 (24,5%) | 19 (38,8%) | p=0,398              |
|                       | > 6 cm    | 10 (20,4%) | 8 (16,3%)  |                      |
| VEGFR2                | ≤ 6 cm    | 16 (32,7%) | 15 (30,6%) | p=1                  |
|                       | > 6 cm    | 10 (20,4%) | 8 (16,3%)  |                      |
| VEGFR3                | ≤ 6 cm    | 11 (22%)   | 22 (44%)   | p=0,039* (Fisher)    |
|                       | > 6 cm    | 1 (2%)     | 16 (32%)   |                      |

**Tabla 23.-** Resultados de la expresión de los factores de la familia del VEGF y sus receptores en célula endotelial, y respecto a la edad y el tamaño del tumor.

| Localización del tumor | VEGF-A               |          | VEGF-B           |            | VEGF-C           |            | VEGF-D               |            |
|------------------------|----------------------|----------|------------------|------------|------------------|------------|----------------------|------------|
|                        | Si                   | No       | Si               | No         | Si               | No         | Si                   | No         |
| LSD <sup>†</sup>       | 8 (16%)              | 11 (22%) | 0                | 21 (36,2%) | 0                | 21 (36,2%) | 7 (12,1%)            | 14 (24,1%) |
| Otras localizaciones   | 19 (38%)             | 12 (24%) | 4 (6,9%)         | 33 (56,9%) | 2 (3,4%)         | 35 (60,3%) | 15 (25,9%)           | 22 (37,9%) |
| p-valor                | p=0,304 ( $\chi^2$ ) |          | p=0,286 (Fisher) |            | p=0,53 (Fisher)  |            | p=0,793 ( $\chi^2$ ) |            |
| LMD                    | 2 (4%)               | 3 (6%)   | 1 (1,7%)         | 4 (6,9%)   | 0 (3,4%)         | 5 (8,6%)   | 2 (3,4%)             | 3 (5,2%)   |
| Otras localizaciones   | 25 (50%)             | 20 (40%) | 3 (5,2%)         | 50 (86,2%) | 2 (3,4%)         | 51 (87,9%) | 20 (34,5%)           | 33 (56,9%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,651              |          | p=0,31           |            | p=1              |            | p=1                  |            |
| LID                    | 8 (16%)              | 0        | 2 (3,4%)         | 7 (12,2%)  | 1 (1,7%)         | 8 (13,8%)  | 6 (10,3%)            | 3 (5,2%)   |
| Otras localizaciones   | 19 (38%)             | 23 (46%) | 2 (3,4%)         | 47 (81%)   | 1 (1,7%)         | 48 (82,8%) | 16 (27,6%)           | 33 (56,9%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,005*             |          | p=0,11           |            | p=0,289          |            | p=0,07               |            |
| LSI                    | 7 (14%)              | 6 (12%)  | 1 (1,7%)         | 15 (25,9%) | 1 (1,7%)         | 15 (25,9%) | 6 (10,3%)            | 10 (17,2%) |
| Otras localizaciones   | 20 (40%)             | 17 (34%) | 3 (5,2%)         | 39 (67,2%) | 1 (1,7%)         | 41 (70,7%) | 16 (27,6%)           | 26 (44,8%) |
| p-valor                | p=1 ( $\chi^2$ )     |          | p=1 (Fisher)     |            | p=0,479 (Fisher) |            | p=1 ( $\chi^2$ )     |            |
| LII                    | 2 (4%)               | 3 (6%)   | 0                | 7 (12,1%)  | 0                | 7 (12,1%)  | 1 (1,7%)             | 6 (10,3%)  |
| Otras localizaciones   | 25 (50%)             | 20 (40%) | 4 (6,9%)         | 47 (81%)   | 2 (3,4%)         | 49 (84,5%) | 21 (36,2%)           | 30 (51,7%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,651              |          | p=1              |            | p=1              |            | p=0,235              |            |

**Tabla 24.-** Resultados de la expresión de los factores de la familia del VEGF en célula endotelial, según la localización del tumor.

<sup>†</sup> LSD.- Lóbulo superior derecho; LMD.- Lóbulo medio del pulmón derecho; LID.- Lóbulo inferior derecho; LSI.- Lóbulo superior izquierdo; LII.- Lóbulo inferior izquierdo.

4.1.2.2.2 Expresión en célula endotelial según la localización del tumor

Respecto a la localización del tumor, sólo la expresión de VEGF-A mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , Fisher).

Muestras procedentes de 8 pacientes (100%) que presentaron la masa tumoral en el lóbulo inferior del pulmón derecho, mostraron expresión de VEGF-A, respecto a los 19 casos (45,2%) en los que se observó expresión de VEGF-A y presentaron el tumor en otras localizaciones (tabla 24).

Finalmente, la expresión de los receptores según la localización del tumor no resultó ser estadísticamente significativa para ninguno de los receptores de la familia del VEGF (tabla 25).

| Localización del tumor | VEGFR1               |            | VEGFR2               |            | VEGFR3           |            |
|------------------------|----------------------|------------|----------------------|------------|------------------|------------|
|                        | Si                   | No         | Si                   | No         | Si               | No         |
| LSD <sup>‡</sup>       | 10 (17,9%)           | 10 (17,9%) | 8 (14,5%)            | 11 (20%)   | 5 (8,6%)         | 16 (27,6%) |
| Otras localizaciones   | 14 (25%)             | 22 (39,2%) | 20 (36,4%)           | 16 (29,1%) | 10 (17,2%)       | 27 (46,6%) |
| p-valor ( $\chi^2$ )   | p=0,601              |            | p=0,506              |            | p=1              |            |
| LMD                    | 0                    | 5 (8,9%)   | 1 (1,8%)             | 4 (7,3%)   | 1 (1,7%)         | 4 (6,9%)   |
| Otras localizaciones   | 24 (42,9%)           | 27 (48,2%) | 27 (49,1%)           | 23 (41,8%) | 14 (24,2%)       | 39 (67,2%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,064              |            | p=0,193              |            | p=1              |            |
| LID                    | 5 (8,9%)             | 4 (7,1%)   | 6 (10,9%)            | 3 (5,5%)   | 3 (5,2%)         | 6 (10,3%)  |
| Otras localizaciones   | 19 (33,9%)           | 28 (50%)   | 22 (40%)             | 24 (43,6%) | 12 (20,7%)       | 37 (63,8%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,475              |            | p=0,469              |            | p=0,682          |            |
| LSI                    | 7 (12,5%)            | 8 (14,3%)  | 10 (18,2%)           | 5 (9,1%)   | 4 (6,9%)         | 12 (20,7%) |
| Otras localizaciones   | 17 (30,4%)           | 24 (42,9%) | 18 (32,7%)           | 22 (40%)   | 11 (19%)         | 31 (53,4%) |
| p-valor                | p=0,965 ( $\chi^2$ ) |            | p=0,259 ( $\chi^2$ ) |            | p=0,651 (Fisher) |            |
| LII                    | 2 (3,6%)             | 5 (8,9%)   | 3 (5,5%)             | 4 (7,37%)  | 2 (3,4%)         | 5 (8,6%)   |
| Otras localizaciones   | 22 (39,3%)           | 27 (48,2%) | 25 (45,4%)           | 23 (41,8%) | 13 (22,4%)       | 38 (65,5%) |
| p-valor (Fisher)       | p=0,686              |            | p=0,705              |            | p=1              |            |

**Tabla 25.-** Resultados de la expresión de los receptores para los factores de la familia del VEGF en célula endotelial, según la localización del tumor.

<sup>‡</sup> LSD.- Lóbulo superior derecho; LMD.- Lóbulo medio del pulmón derecho; LID.- Lóbulo inferior derecho; LSI.- Lóbulo superior izquierdo; LII.- Lóbulo inferior izquierdo.

| Factores y receptores familia VEGF |                      | Adenocarcinoma | Epidermoide | Células Grandes | Células Pequeñas |
|------------------------------------|----------------------|----------------|-------------|-----------------|------------------|
| VEGF-A                             | Si                   | 9 (69,2%)      | 11 (50%)    | 5 (62,5%)       | 3 (37,5%)        |
|                                    | No                   | 4 (30,8%)      | 11 (50%)    | 3 (37,5%)       | 5 (62,5%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,166        | p=1         | p=0,48          | p=0,48           |
| VEGF-B                             | Si                   | 2 (13,3%)      | 2 (8%)      | 0               | 0                |
|                                    | No                   | 13 (86,7%)     | 23 (92%)    | 8 (100%)        | 11 (100%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,005*       | p=0,00002*  |                 |                  |
| VEGF-C                             | Si                   | 1 (6,6%)       | 1 (4%)      | 0               | 0                |
|                                    | No                   | 14 (93,4%)     | 24 (96%)    | 8 (100%)        | 11 (100%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,001*       | p=0,000004* |                 |                  |
| VEGF-D                             | Si                   | 7 (46,6%)      | 12 (48%)    | 0               | 3 (27,3%)        |
|                                    | No                   | 8 (53,4%)      | 13 (52%)    | 8 (100%)        | 8 (72,7%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,796        | p=0,841     |                 | p=0,132          |
| VEGFR1                             | Si                   | 6 (40%)        | 10 (41,7%)  | 4 (57,1%)       | 5 (45,4%)        |
|                                    | No                   | 9 (60%)        | 14 (58,3%)  | 3 (42,9%)       | 6 (54,6%)        |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,439        | p=0,414     | p=0,705         | p=0,763          |
| VEGFR2                             | Si                   | 8 (53,3%)      | 11 (45,8%)  | 5 (71,4%)       | 5 (50%)          |
|                                    | No                   | 7 (46,7%)      | 13 (54,1%)  | 2 (28,6%)       | 5 (50%)          |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,796        | p=0,683     | p=0,257         | p=1              |
| VEGFR3                             | Si                   | 5 (33,3%)      | 5 (20%)     | 2 (25%)         | 3 (30%)          |
|                                    | No                   | 10 (66,7%)     | 20 (80%)    | 6 (75%)         | 7 (70%)          |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,197        | p=0,003*    | p=0,157         | p=0,206          |

**Tabla 26.-** Resultados de la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula endotelial, según el tipo histológico.

#### 4.1.2.2.2.3 Expresión en célula endotelial según el tipo histológico

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) para VEGF-B y VEGF-C, en los tumores de tipo adenocarcinoma y epidermoide. También el receptor VEGFR3 mostró diferencias estadísticamente significativas sólo para el tipo epidermoide ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ).

El resto de factores y receptores de la familia del VEGF no mostraron diferencias estadísticamente significativas según la estirpe histológica del tumor (tabla 26 y figuras 36 y 37).



Los tumores de células grandes se caracterizaban por expresar sólo VEGF-A. También se observó que VEGF-B y VEGF-C no se expresaban en los tumores de células pequeñas, y se expresaban en un pequeño porcentaje de tumores del tipo adenocarcinoma y epidermoide (tabla 23 y figura 20).

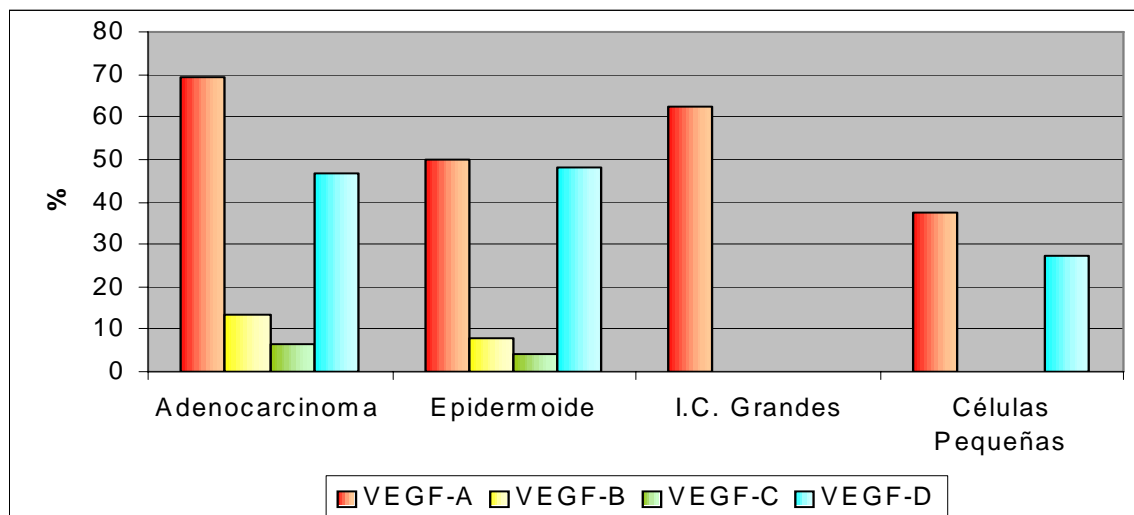


Figura 20.- Expresión de los factores de la familia del VEGF en célula endotelial, según tipo histológico.

El receptor VEGFR3 se expresaba en menor porcentaje de muestras que VEGFR1 y VEGFR2, principalmente en las de pacientes que presentaban tumores del tipo epidermoide, células grandes y células pequeñas (tabla 23 y figura 21).

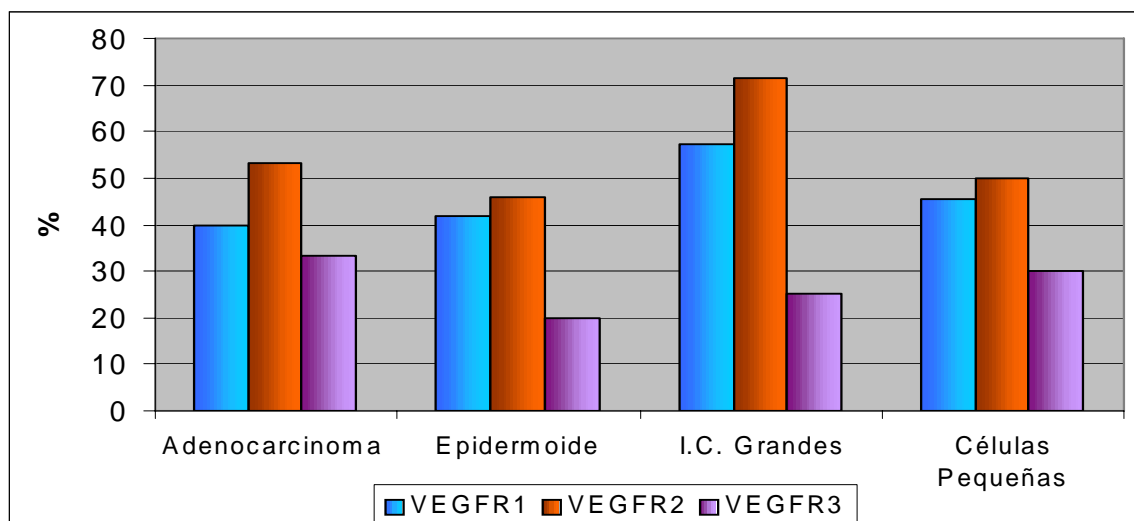


Figura 21.- Expresión de los receptores de la familia del VEGF en célula endotelial, según tipo histológico.

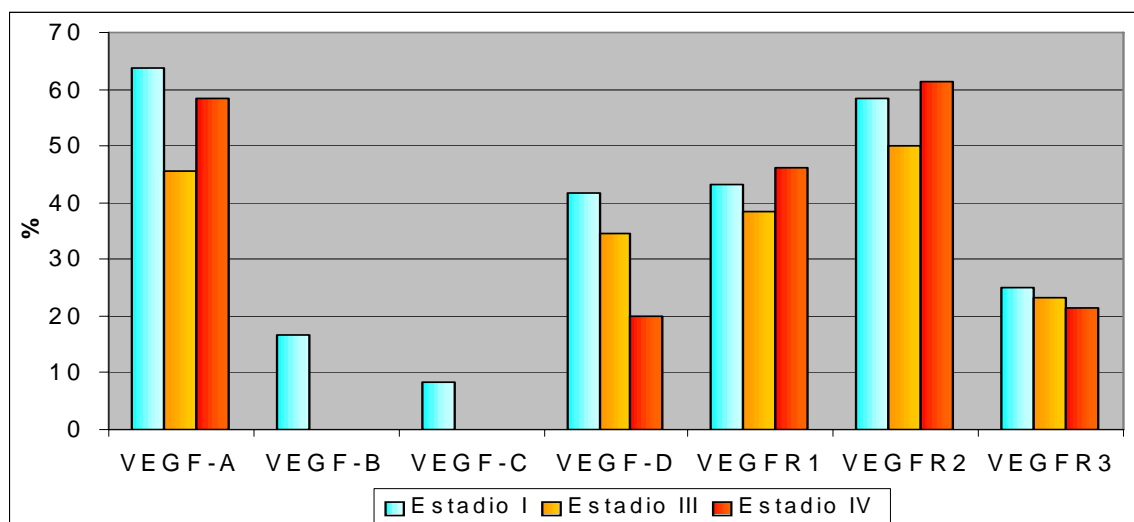
#### 4.1.2.2.2.4 Expresión en célula endotelial según la estadificación

La expresión de los factores de la familia del VEGF en célula endotelial, respecto a la estadificación TNM, resultó ser estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) para VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGFR3.

Las expresiones de VEGF-B y VEGF-C fueron estadísticamente significativas en el estadio I, donde sólo el 16,7% y el 8,3%, respectivamente, de las muestras los expresaban, mientras que ninguna de las muestras de pacientes en estadios III y IV los expresaron.

La expresión de VEGF-D fue significativa sólo en el estadio IV, donde el 20% de los tumores lo expresaban. Además, se observó una tendencia decreciente en la expresión de VEGF-D a medida que se avanza en el estadio (figura 22).

Finalmente, la expresión de VEGFR3 fue significativa en el estadio III y IV, donde sólo el 23,1% y el 21,4%, respectivamente, de los tumores expresaron VEGFR3 (tabla 27).



**Figura 22.-** Expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula endotelial, según el estadio.

| Factores y receptores familia VEGF |                      | Estadio I  | Estadio II | Estadio III | Estadio IV |
|------------------------------------|----------------------|------------|------------|-------------|------------|
| VEGF-A                             | Si                   | 7 (63,7%)  | 4 (80%)    | 10 (45,5%)  | 7 (58,3%)  |
|                                    | No                   | 4 (36,3%)  | 1 (20%)    | 12 (54,5%)  | 5 (41,7%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,366    | ‡          | p=0,67      | p=0,564    |
| VEGF-B                             | Si                   | 2 (16,7%)  | 2 (40%)    | 0           | 0          |
|                                    | No                   | 10 (83,3%) | 3 (60%)    | 26 (100%)   | 15 (100%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,021*   | ‡          |             |            |
| VEGF-C                             | Si                   | 1 (8,3%)   | 1 (20%)    | 0           | 0          |
|                                    | No                   | 11 (91,7%) | 4 (80%)    | 26 (100%)   | 15 (100%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,004*   | ‡          |             |            |
| VEGF-D                             | Si                   | 5 (41,7%)  | 1 (20%)    | 9 (34,6%)   | 3 (20%)    |
|                                    | No                   | 7 (58,3%)  | 4 (80%)    | 17 (65,4%)  | 12 (80%)   |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,564    | ‡          | p=0,117     | p=0,020*   |
| VEGFR1                             | Si                   | 4 (33,3%)  | 4 (80%)    | 10 (38,5%)  | 6 (46,2%)  |
|                                    | No                   | 8 (66,7%)  | 1 (20%)    | 16 (61,1%)  | 7 (53,8%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,248    | ‡          | p=0,239     | p=0,782    |
| VEGFR2                             | Si                   | 4 (58,3%)  | 4 (80%)    | 13 (50%)    | 8 (61,5%)  |
|                                    | No                   | 8 (41,7%)  | 1 (20%)    | 13 (50%)    | 5 (38,5%)  |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,248    | ‡          | p=1         | p=0,405    |
| VEGFR3                             | Si                   | 3 (25%)    | 2 (40%)    | 6 (23,1%)   | 3 (21,4%)  |
|                                    | No                   | 9 (75%)    | 3 (60%)    | 20 (76,9%)  | 11 (78,6%) |
|                                    | p-valor ( $\chi^2$ ) | p=0,083    | ‡          | p=0,006*    | p=0,033*   |

**Tabla 27.-** Resultados de la expresión de factores y receptores de la familia del VEGF en célula endotelial, según el estadio TNM.

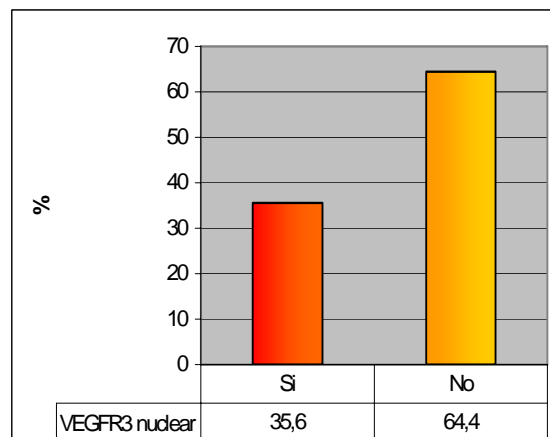
‡ No se pudo aplicar test estadístico por el escaso número de pacientes.

#### 4.1.2.2.3 Estudio de la expresión de VEGFR3 en el núcleo de las células tumorales

El estudio de la expresión de VEGFR3 reveló que, además de la localización de este receptor en la membrana y/o citosol de células tumorales y células endoteliales, se localizaba, también, en el núcleo de las células tumorales de 21 (35,6%) pacientes de los 59 estudiados (figura 23 y 24).

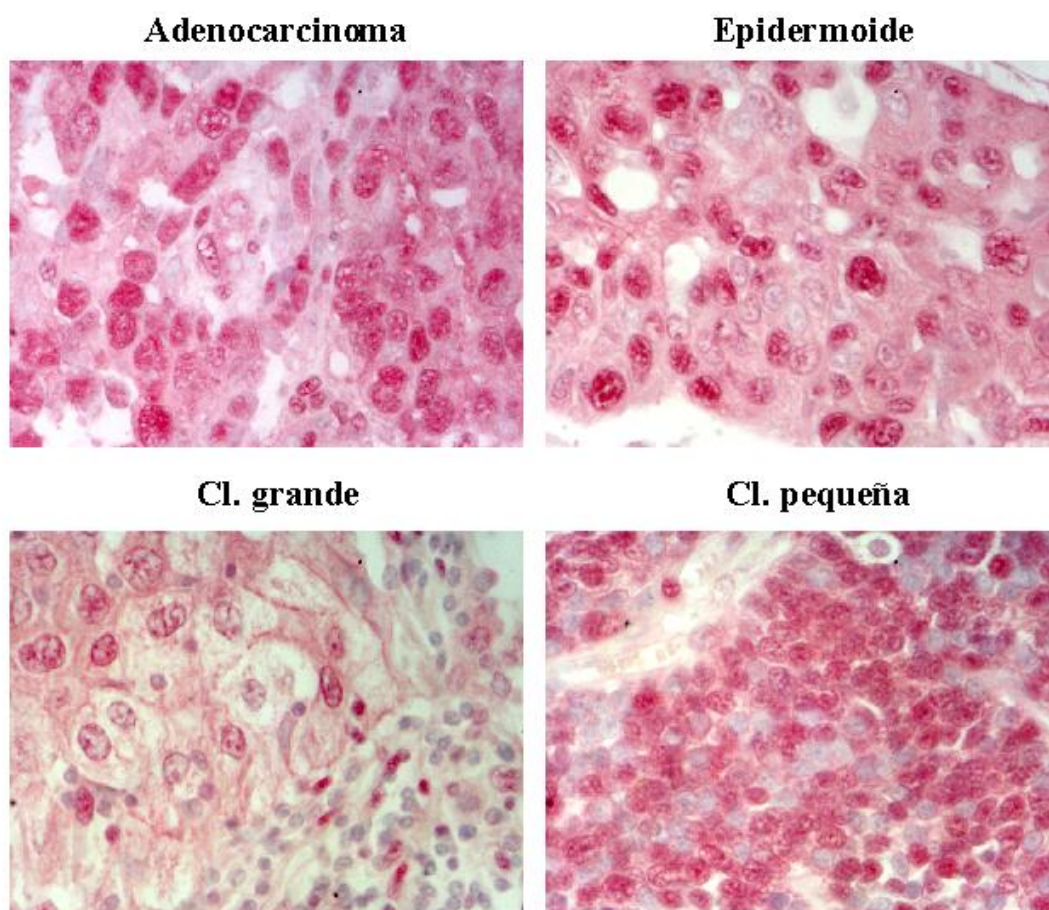
| Estirpe histológica | VEGFR3 Nuclear |      |
|---------------------|----------------|------|
|                     | Casos          | %    |
| Adenocarcinoma      | 2              | 9,5  |
| Epidermoide         | 16             | 76,2 |
| Células grandes     | 1              | 4,8  |
| Células pequeñas    | 2              | 9,5  |
| Estadio             | VEGFR3 Nuclear |      |
|                     | Casos          | %    |
| I                   | 6              | 28,6 |
| II                  | 2              | 9,5  |
| III                 | 12             | 57,1 |
| IV                  | 1              | 4,8  |

**Tabla 28.-** Expresión nuclear de VEGFR3 respecto a la estirpe histológica y el estadio.



**Figura 23.-** Expresión de VEGFR3 en el núcleo de las células tumorales.

La localización nuclear de VEGFR3 se observó principalmente en muestras de pacientes con tumores del tipo epidermoide (76,2%). Respecto al estadio, se observó VEGFR3 nuclear en los estadios más avanzados (III-IV, 61,9% de los casos) (tabla 28).



**Figura 24.-** Inmunohistoquímicas para VEGFR3 en los distintos tipos histológicos donde se observa su expresión nuclear (400x).

#### 4.1.2.2.4 Análisis de la supervivencia

El análisis de la supervivencia se realizó en 54 pacientes, de los que se pudo obtener información acerca de su estado vital después de transcurridos dos años desde la fecha del diagnóstico. En el anexo II se muestran las tablas de supervivencia.

Treinta y cinco pacientes (64,8%) habían fallecido, mientras que sólo 19 (35,2%) continuaban con vida pasado este tiempo. El análisis estadístico para la supervivencia global resultó significativo ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ). El tiempo medio de supervivencia entre los pacientes fallecidos fue de  $9,4 \pm 1$  meses (tabla 29).

##### 4.1.2.2.4.1 Análisis de la supervivencia según la edad y el tamaño del tumor

Catorce pacientes (53,8%) de los 26 menores de 67 años y 21 (75%) de los 28 mayores de 67 años, habían fallecido pasados dos años desde la fecha de diagnóstico (tabla 29 y figura 25).

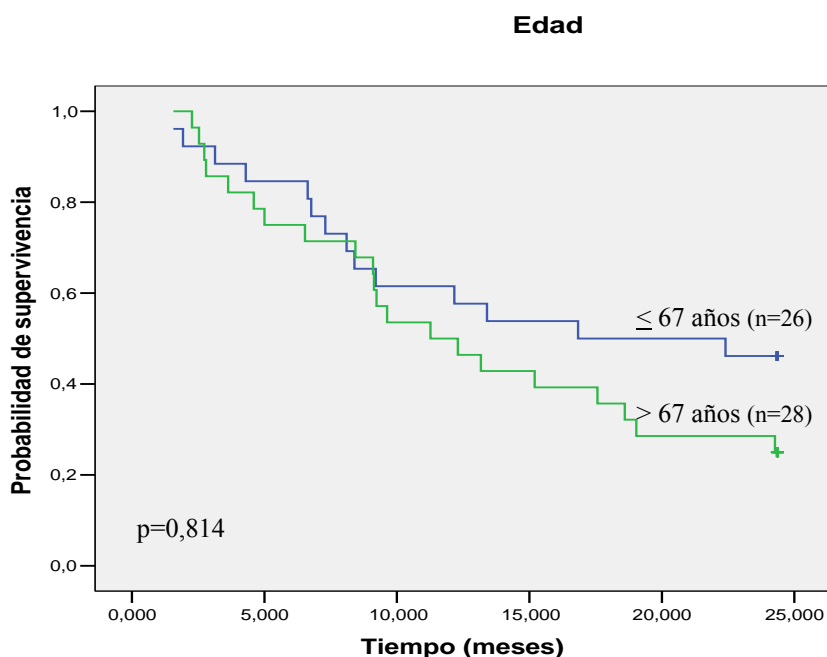


Figura 25.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la edad.

| Expresión factores y receptores VEGF |                | Número de Casos<br>(Fallecidos/totales) | p-valor ( $\chi^2$ ) | Media $\pm$ Std. Error | p-valor (Log Rank) |
|--------------------------------------|----------------|---|----------------------|------------------------|--------------------|
| <b>Pacientes</b>                     | Fallecidos     | 35/54 (64,8%)                           | p=0,029*             | 9,405 $\pm$ 1,02       |                    |
|                                      | Vivos          | 19/54 (35,2%)                           |                      |                        |                    |
| <b>Edad</b>                          | $\leq$ 67 años | 14/26 (53,8%)                           | p=0,104              | 15,944 $\pm$ 1,73      | p=0,814            |
|                                      | > 67 años      | 21/28 (75%)                             |                      | 13,486 $\pm$ 1,55      |                    |
| <b>Tamaño</b>                        | $\leq$ 6 cm    | 15/31 (48,4%)                           | p=0,016*             | 17,306 $\pm$ 1,54      | p=0,004*           |
|                                      | > 6 cm         | 15/17 (88,2%)                           |                      | 10,953 $\pm$ 1,75      |                    |
| <b>Estirpe Histológica</b>           | Adenocarcinoma | 9/13 (69,2%)                            | p=0,745              | 14,418 $\pm$ 2,38      | p=0,914            |
|                                      | Epidermoide    | 14/24 (58,3%)                           |                      | 14,879 $\pm$ 1,81      |                    |
|                                      | Cl. Grandes    | 5/8 (62,5%)                             |                      | 14,304 $\pm$ 2,99      |                    |
|                                      | Cl. Pequeñas   | 7/9 (77,8%)                             |                      | 14,796 $\pm$ 2,63      |                    |
| <b>TNM</b>                           | Estadio I      | 2/12 (16,7%)                            | p=0,0000004*         | 23,792 $\pm$ 0,54      | p=0,0000006*       |
|                                      | Estadio II     | 0/5                                     |                      | 24,367                 |                    |
|                                      | Estadio III    | 18/22 (81,8%)                           |                      | 12,173 $\pm$ 1,67      |                    |
|                                      | Estadio IV     | 15/15 (100%)                            |                      | 7,8 $\pm$ 1,16         |                    |
| <b>VEGF-A</b><br>(cl. tumoral)       | Si             | 23/36 (63,9%)                           | p=1                  | 14,315 $\pm$ 1,5       | p=0,901            |
|                                      | No             | 12/18 (66,7%)                           |                      | 15,378 $\pm$ 1,8       |                    |
| <b>VEGF-B</b><br>(cl. tumoral)       | Si             | 15/22 (68,2%)                           | p=0,889              | 13,911 $\pm$ 1,86      | p=0,649            |
|                                      | No             | 20/32 (62,5%)                           |                      | 15,191 $\pm$ 1,49      |                    |
| <b>VEGF-C</b><br>(cl. tumoral)       | Si             | 27/38 (71,1%)                           | p=0,243              | 13,796 $\pm$ 1,39      | p=0,184            |
|                                      | No             | 8/16 (50%)                              |                      | 16,742 $\pm$ 2,07      |                    |
| <b>VEGF-D</b><br>(cl. tumoral)       | Si             | 19/30 (63,3%)                           | p=1                  | 15,01 $\pm$ 1,57       | p=0,754            |
|                                      | No             | 16/24 (66,7%)                           |                      | 14,243 $\pm$ 1,75      |                    |
| <b>VEGFR1</b><br>(cl. tumoral)       | Si             | 27/42 (64,3%)                           | p=1<br>(Fisher)      | 14,732 $\pm$ 1,34      | p=0,905            |
|                                      | No             | 8/12 (66,7%)                            |                      | 14,45 $\pm$ 2,4        |                    |
| <b>VEGFR2</b><br>(cl. tumoral)       | Si             | 32/46 (69,6%)                           | p=0,113<br>(Fisher)  | 13,446 $\pm$ 1,26      | p=0,059            |
|                                      | No             | 3/8 (37,5%)                             |                      | 21,7 $\pm$ 1,64        |                    |
| <b>VEGFR3</b><br>(cl. tumoral)       | Si             | 28/43 (65,1%)                           | p=1<br>(Fisher)      | 14,713 $\pm$ 1,31      | p=0,976            |
|                                      | No             | 7/11 (63,6%)                            |                      | 14,497 $\pm$ 2,58      |                    |
| <b>VEGFR3</b><br>(cl. tumoral)       | Nuclear        | 10/20 (50%)                             | p=0,169              | 17,253 $\pm$ 1,96      | p=0,098            |
|                                      | No nuclear     | 24/33 (72,7%)                           |                      | 13,141 $\pm$ 1,43      |                    |
| <b>VEGF-A</b><br>(cl. endotelial)    | Si             | 16/27 (59,3%)                           | p=1                  | 15,391 $\pm$ 1,69      | p=0,956            |
|                                      | No             | 12/20 (60%)                             |                      | 15,822 $\pm$ 1,89      |                    |
| <b>VEGF-B</b><br>(cl. endotelial)    | Si             | 1/4 (25%)                               | p=0,119<br>(Fisher)  | 24,342 $\pm$ 0,02      | p=0,1              |
|                                      | No             | 34/50 (68%)                             |                      | 13,895 $\pm$ 1,2       |                    |
| <b>VEGF-C</b><br>(cl. endotelial)    | Si             | 1/2 (50%)                               | p=1<br>(Fisher)      | 24,317 $\pm$ 0,03      | p=0,447            |
|                                      | No             | 34/52 (65,4%)                           |                      | 14,298 $\pm$ 1,18      |                    |
| <b>VEGF-D</b><br>(cl. endotelial)    | Si             | 8/19 (42,1%)                            | p=0,023*             | 18,381 $\pm$ 1,92      | p=0,014*           |
|                                      | No             | 27/35 (77,1%)                           |                      | 12,654 $\pm$ 1,35      |                    |
| <b>VEGFR1</b><br>(cl. endotelial)    | Si             | 16/23 (64,3%)                           | p=1<br>(Fisher)      | 14,565 $\pm$ 1,73      | p=0,509            |
|                                      | No             | 17/29 (66,7%)                           |                      | 15,551 $\pm$ 1,58      |                    |
| <b>VEGFR2</b><br>(cl. endotelial)    | Si             | 19/27 (70,4%)                           | p=0,431              | 13,599 $\pm$ 1,58      | p=0,201            |
|                                      | No             | 14/25 (56%)                             |                      | 16,752 $\pm$ 1,68      |                    |
| <b>VEGFR3</b><br>(cl. endotelial)    | Si             | 6/12 (50%)                              | p=0,311              | 18,35 $\pm$ 2,42       | p=0,207            |
|                                      | No             | 28/41 (68,3%)                           |                      | 13,883 $\pm$ 1,29      |                    |

**Tabla 29.-** Supervivencia según la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF.

\* p<0,05

Quince pacientes (48,4%) de los 31 con tumores menores de seis centímetros y 15 pacientes (88,2%) de los 17 con tumores mayores de seis centímetros, habían fallecido pasados dos años desde la fecha de diagnóstico. El análisis estadístico del porcentaje de la supervivencia a los dos años según el tamaño del tumor resultó ser significativo ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ). El tiempo medio de supervivencia resultó ser superior en los pacientes que presentaron tumores menores o iguales de seis centímetros ( $17,3 \pm 1,5$  meses), respecto a los pacientes con tumores superiores a los seis centímetros ( $10,9 \pm 1,7$  meses). Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , Log Rank) (tabla 29 y figura 26).

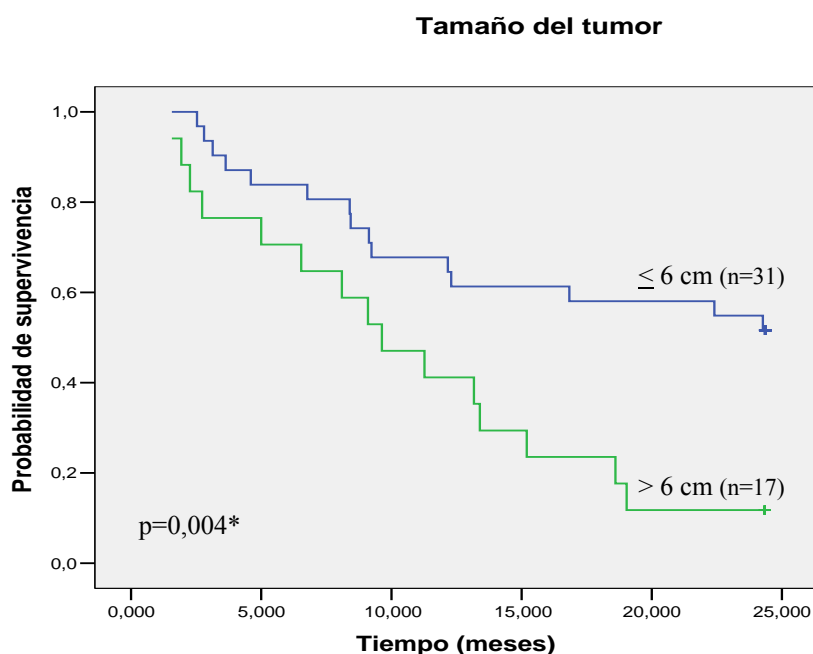
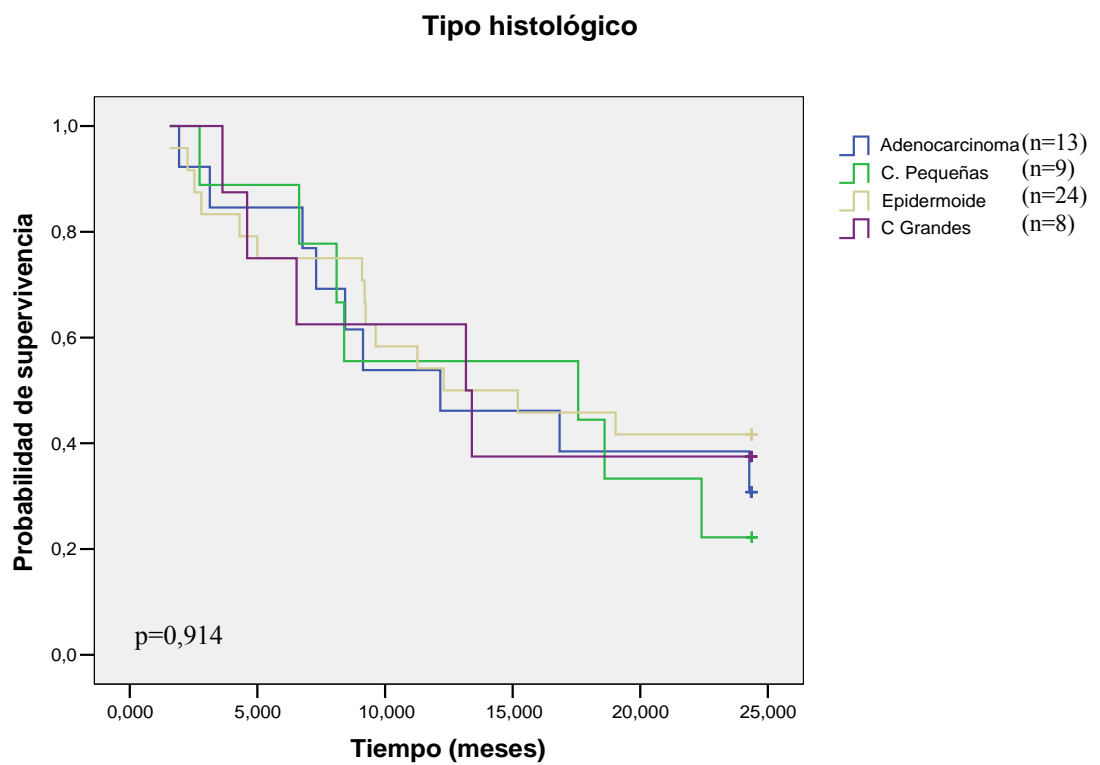


Figura 26.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el tamaño del tumor.

\*  $p < 0,05$  Log-Rank (Mantel-Cox)

4.1.2.2.4.2 Análisis de la supervivencia según el tipo histológico

El análisis de la supervivencia, según las distintas estirpes histológicas, no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de pacientes fallecidos ( $p > 0,05$ ,  $\chi^2$ ), ni en el tiempo medio de supervivencia ( $p > 0,05$ , Log-Rank) (tabla 29 y figura 27).

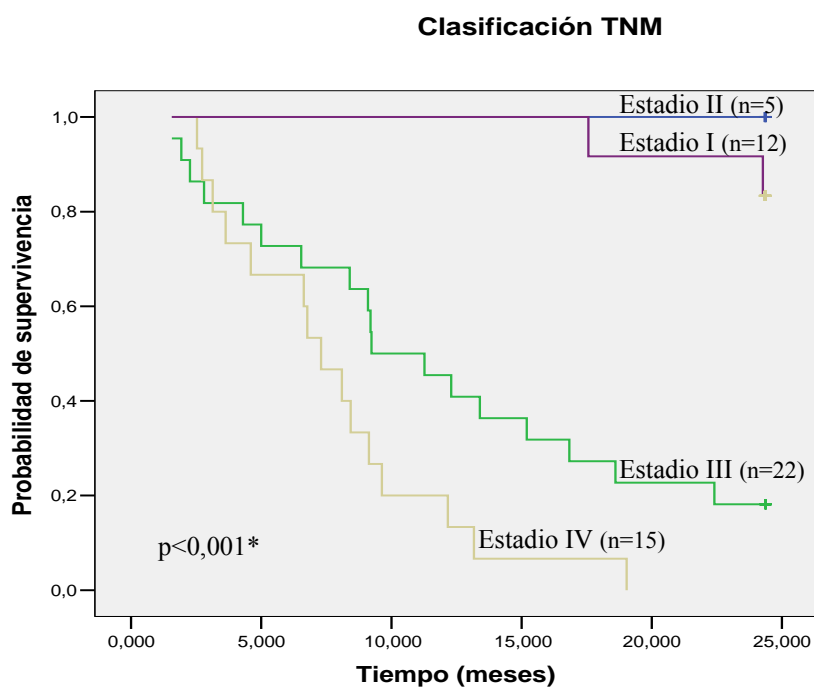


**Figura 27.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el tipo histológico del tumor.



#### 4.1.2.2.4.3 Análisis de la supervivencia según la estadificación

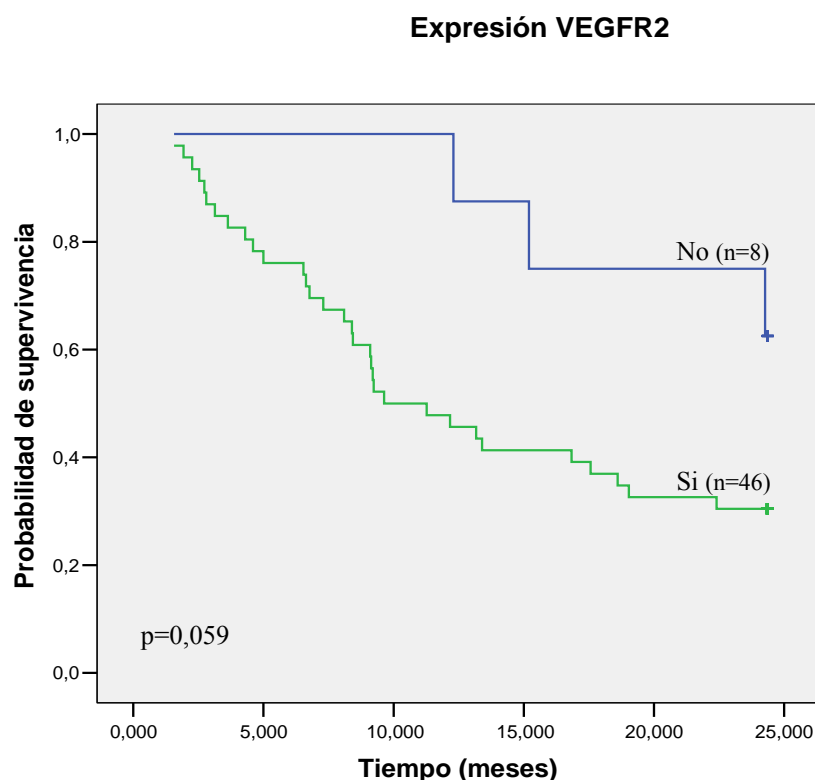
Treinta y tres (89,1%) de los 37 pacientes con tumores en estadios avanzados (estadios III y IV) habían fallecido al cabo de dos años desde la fecha del diagnóstico, lo que resultó ser estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ), en comparación con los 2 pacientes (11,7%) fallecidos de los 17 con tumores clasificados como estadios I y II. El tiempo de supervivencia resultó ser superior en los estadios más bajos (estadio I:  $23,7 \pm 0,5$ ; estadio II:  $24,3$ ), respecto a los estadios más altos (estadio III:  $12,1 \pm 1,6$ ; estadio IV:  $7,8 \pm 1,1$ ), lo que resultó ser estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ , Log-Rank) (tabla 29 y figura 28).



**Figura 28.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la estadificación del tumor.  
\*  $p < 0,05$  Log-Rank (Mantel-Cox)

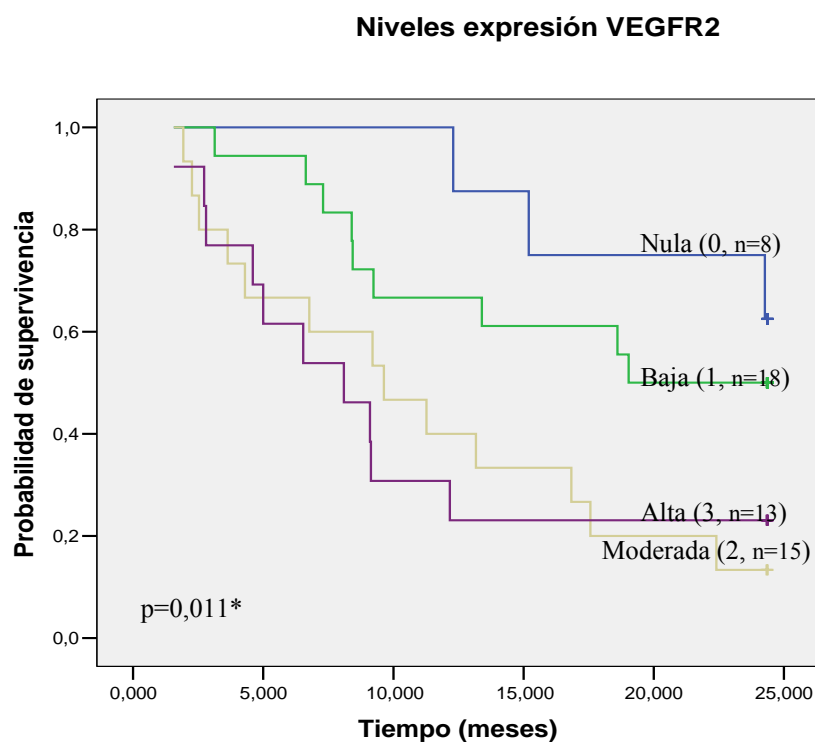
#### 4.1.2.2.4.4 Análisis de la supervivencia según la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral

El análisis de la supervivencia, según la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de pacientes fallecidos ( $p > 0,05$ ,  $\chi^2$ ), ni en el tiempo medio de supervivencia ( $p > 0,05$ , Log-Rank), para ninguno de ellos. Sin embargo, se pudo observar una tendencia a la disminución de la supervivencia en aquellos pacientes cuyos tumores expresaban VEGFR2 ( $13,4 \pm 1,2$ ), respecto a aquellos que no lo expresaban ( $21,7 \pm 1,6$ ), lo cual se aproxima a la significación estadística ( $p = 0,05$ , Log-Rank) (tabla 29 y figura 29).



**Figura 29.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) para la expresión de VEGFR2 en célula tumoral.

El análisis de la supervivencia, según los niveles de expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral, mostró diferencias estadísticamente significativas en el tiempo medio de supervivencia ( $p < 0,05$ , Log-Rank) sólo para la expresión de VEGFR2. Se pudo observar que los pacientes cuyos tumores no mostraban expresión para VEGFR2 tenían una supervivencia media de  $21,7 \pm 1,6$  meses; aquellos cuyos tumores lo expresaban con niveles bajos tenían una supervivencia media de  $17,4 \pm 1,8$  meses; aquellos en los que se expresaba de manera moderada tenían una supervivencia media de  $11,3 \pm 2$  meses, y en los que se observó una alta expresión de VEGFR2 la supervivencia media fue de  $10,3 \pm 2,2$  meses (tabla 30 y figura 30).

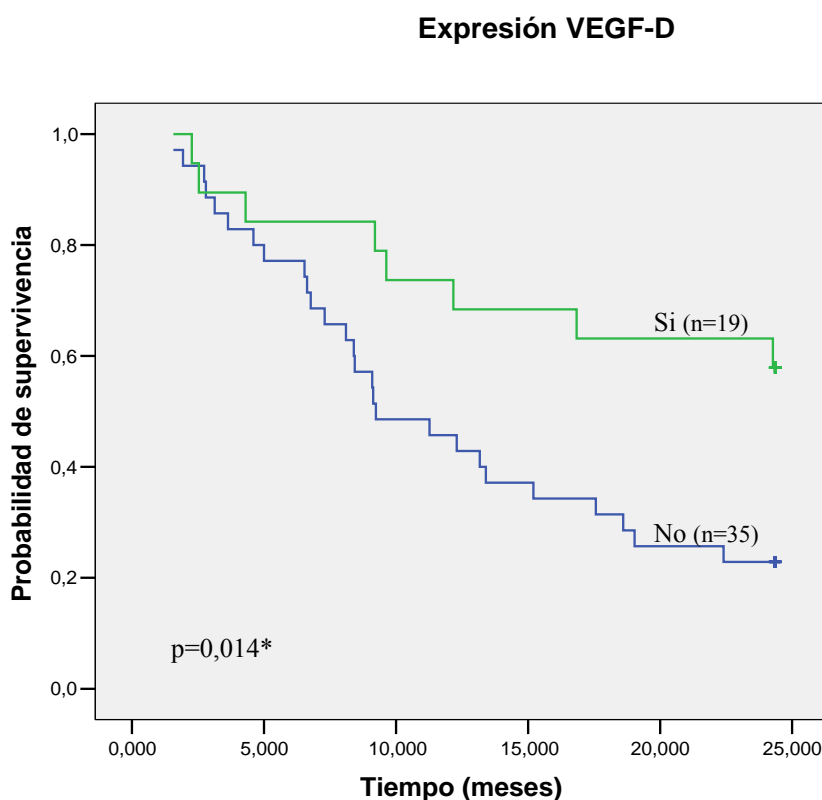


**Figura 30.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según los niveles de expresión de VEGFR2 en célula tumoral.

\*  $p < 0,05$  Log-Rank (Mantel-Cox)

#### 4.1.2.2.4.5 Análisis de la supervivencia según la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula endotelial

El análisis de la supervivencia, según la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula endotelial, mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de pacientes fallecidos ( $p > 0,05$ ,  $\chi^2$ ) y en el tiempo medio de supervivencia ( $p > 0,05$ , Log-Rank), sólo para la expresión de VEGF-D. Ocho (42,1%) de los 19 pacientes en los cuales el endotelio vascular tumoral expresaba VEGF-D habían fallecido al cabo de dos años, respecto a los 27 (77,1%) de los 35 pacientes en los que el endotelio no lo expresaba y habían fallecido. Además, el tiempo medio de supervivencia fue superior en aquellos pacientes cuyos tumores expresaban el factor VEGF-D ( $18,3 \pm 1,9$ ) en las células endoteliales, respecto a aquellos en los que no se expresaba ( $12,6 \pm 1,3$ ) (tabla 29 y figura 31).



**Figura 31.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) para la expresión de VEGF-D en célula endotelial.

\*  $p < 0,05$  Log-Rank (Mantel-Cox)

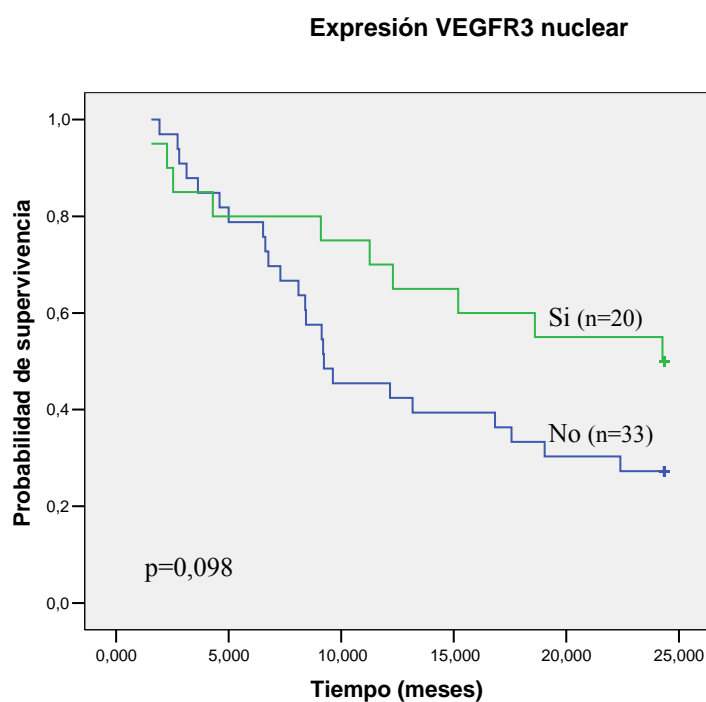
| Niveles expresión factores y receptores VEGF |              | Número de Casos (Fallecidos/totales) | Media +Std. Error | p-valor (Log Rank) |
|--|--------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------|
| VEGF-A                                       | Nula (0)     | 12/18 (66,6%)                        | 15,378±1,8        | p=0,909            |
|  | Baja (1)     | 13/19 (68,4%)                        | 14,996±1,99       |                    |
|  | Moderada (2) | 6/11 (54,5%)                         | 14,624±2,76       |                    |
|  | Alta (3)     | 4/6 (66,6%)                          | 11,589±3,8        |                    |
| VEGF-B                                       | Nula (0)     | 20/32 (62,5%)                        | 15,191±1,49       | p=0,592            |
|  | Baja (1)     | 12/16 (75%)                          | 12,269±2,03       |                    |
|  | Moderada (2) | 2/3 (66,6%)                          | 19,422±3,99       |                    |
|  | Alta (3)     | 1/3 (33,3%)                          | 17,156±5,88       |                    |
| VEGF-C                                       | Nula (0)     | 8/16 (50%)                           | 16,742±2,07       | p=0,224            |
|  | Baja (1)     | 16/24 (66,6%)                        | 15,383±1,73       |                    |
|  | Moderada (2) | 4/5 (80%)                            | 8,907±3,66        |                    |
|  | Alta (3)     | 7/9 (77,7%)                          | 12,28±2,54        |                    |
| VEGF-D                                       | Nula (0)     | 16/24 (66,6%)                        | 14,243±1,75       | p=0,156            |
|  | Baja (1)     | 15/19 (78,9%)                        | 12,186±1,8        |                    |
|  | Moderada (2) | 3/9 (33,3%)                          | 18,904±2,69       |                    |
|  | Alta (3)     | 1/2 (50%)                            | 24,317±0,03       |                    |
| VEGFR1                                       | Nula (0)     | 8/12 (66,6%)                         | 14,450±2,4        | p=0,176            |
|  | Baja (1)     | 10/20 (50%)                          | 17,665±1,64       |                    |
|  | Moderada (2) | 8/10 (80%)                           | 11,41±2,64        |                    |
|  | Alta (3)     | 9/12 (75%)                           | 12,611±2,7        |                    |
| VEGFR2                                       | Nula (0)     | 3/8 (37,5%)                          | 21,7±1,64         | p=0,011*           |
|  | Baja (1)     | 9/18 (50%)                           | 17,415±1,84       |                    |
|  | Moderada (2) | 13/15 (86,6%)                        | 11,349±2,02       |                    |
|  | Alta (3)     | 10/13 (76,9%)                        | 10,372±2,26       |                    |
| VEGFR3                                       | Nula (0)     | 7/11 (63,6%)                         | 14,497±2,58       | p=0,113            |
|  | Baja (1)     | 13/22 (59%)                          | 15,977±1,7        |                    |
|  | Moderada (2) | 7/13 (53,8%)                         | 15,649±2,66       |                    |
|  | Alta (3)     | 8/8 (100%)                           | 9,717±2,47        |                    |

**Tabla 30.-** Supervivencia según los niveles de expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral.

\* p<0,05

#### 4.1.2.2.4.6 Análisis de la supervivencia según la expresión de VEGFR3 en el núcleo de las células tumorales

El análisis de la supervivencia, según la localización nuclear de VEGFR3 en las células tumorales, no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de pacientes fallecidos ( $p>0,05$ ,  $\chi^2$ ), ni en el tiempo medio de supervivencia ( $p>0,05$ , Log-Rank). Sin embargo, se pudo observar una tendencia a la disminución del tiempo medio de supervivencia en aquellos pacientes que no mostraban VEGFR3 en el núcleo de las células tumorales (13,1±1,4 meses), respecto a los que si lo mostraban (17,2±1,9 meses) (tabla 29 y figura 32).



**Figura 32.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) para la localización nuclear de VEGFR3 en célula tumoral.

### 4.1.3 Tejido Peritumoral

#### 4.1.3.1 Población. Características clínicas y anatomopatológicas

De 10 pacientes sometidos a resección quirúrgica, se estudiaron 10 muestras de tejido no patológico obtenido en el límite de la extensión tumoral, según criterio del cirujano torácico mediante la observación directa del tumor.

Las muestras sanas y las muestras de tejido peritumoral se obtuvieron en cada caso del mismo paciente, por lo que las características poblacionales se detallan en el apartado 4.1.1.1 y en la [tabla 8](#).

El estudio anatomopatológico de estas muestras mostró que 7 (70%) se habían obtenido del parénquima alveolar sano y, que 3 (30%) contenían nichos tumorales en la mayor parte del fragmento estudiado. Dos de las muestras con nichos tumorales correspondían a estirpe epidermoide y una a adenocarcinoma.

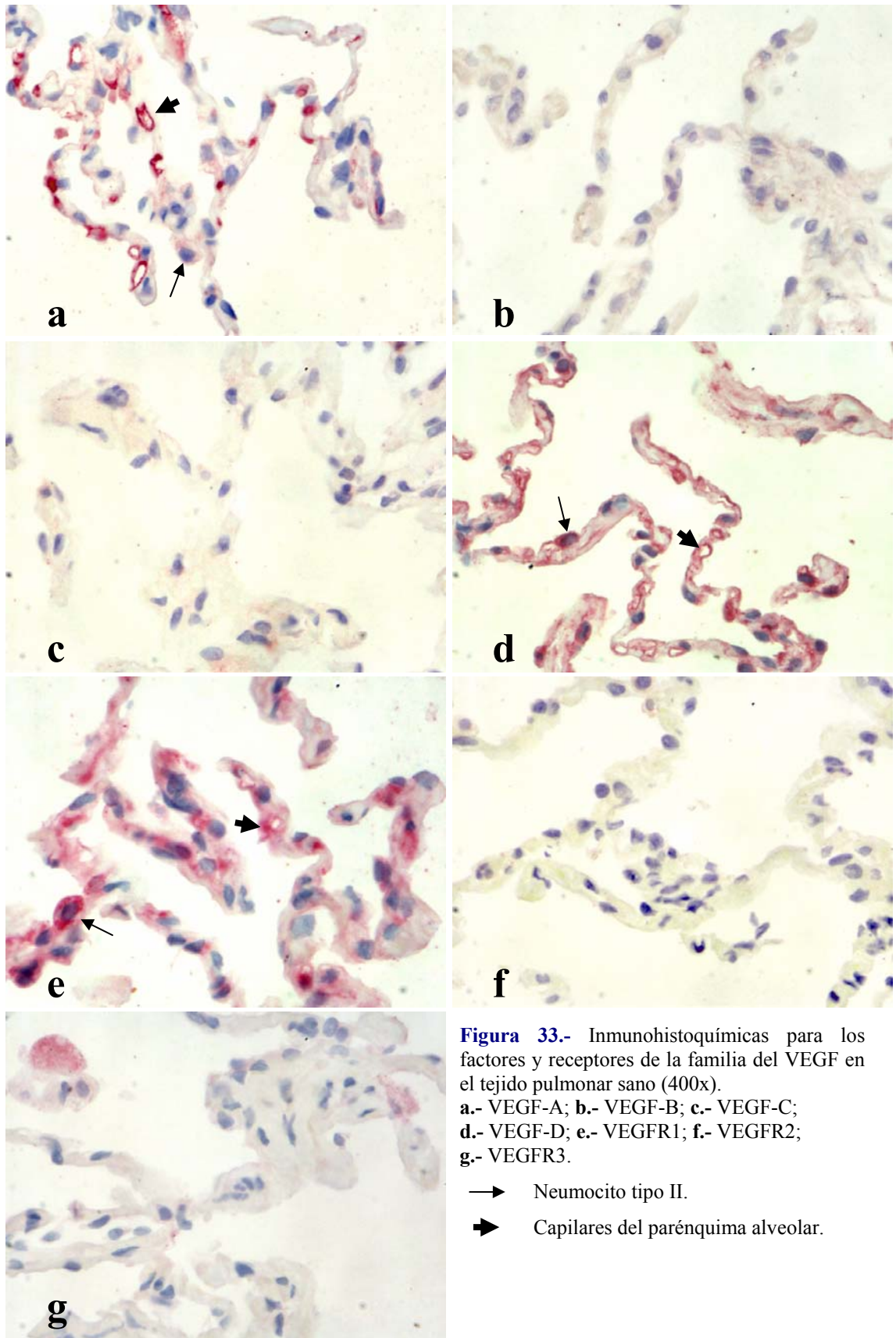
4.1.3.2 Estudio de la expresión de los factores de la familia del VEGF y sus receptores

Al realizar el estudio de los factores y receptores de la familia del VEGF en el tejido peritumoral, se pudo observar que en los 7 pacientes cuyos tejidos peritumorales resultaron ser de parénquima alveolar, la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF fue la misma que la obtenida para sus correspondientes muestras de tejido sano, excepto para 1 paciente donde se observó expresión de VEGF-B en el endotelio de los septos alveolares de la muestra de tejido sano y que no mostró esta expresión en la muestra de tejido peritumoral, además de otro paciente en cuya muestra se observó expresión de VEGFR2 en el epitelio del tejido sano y no se detectó en el epitelio de la muestra del tejido peritumoral (tabla 31).

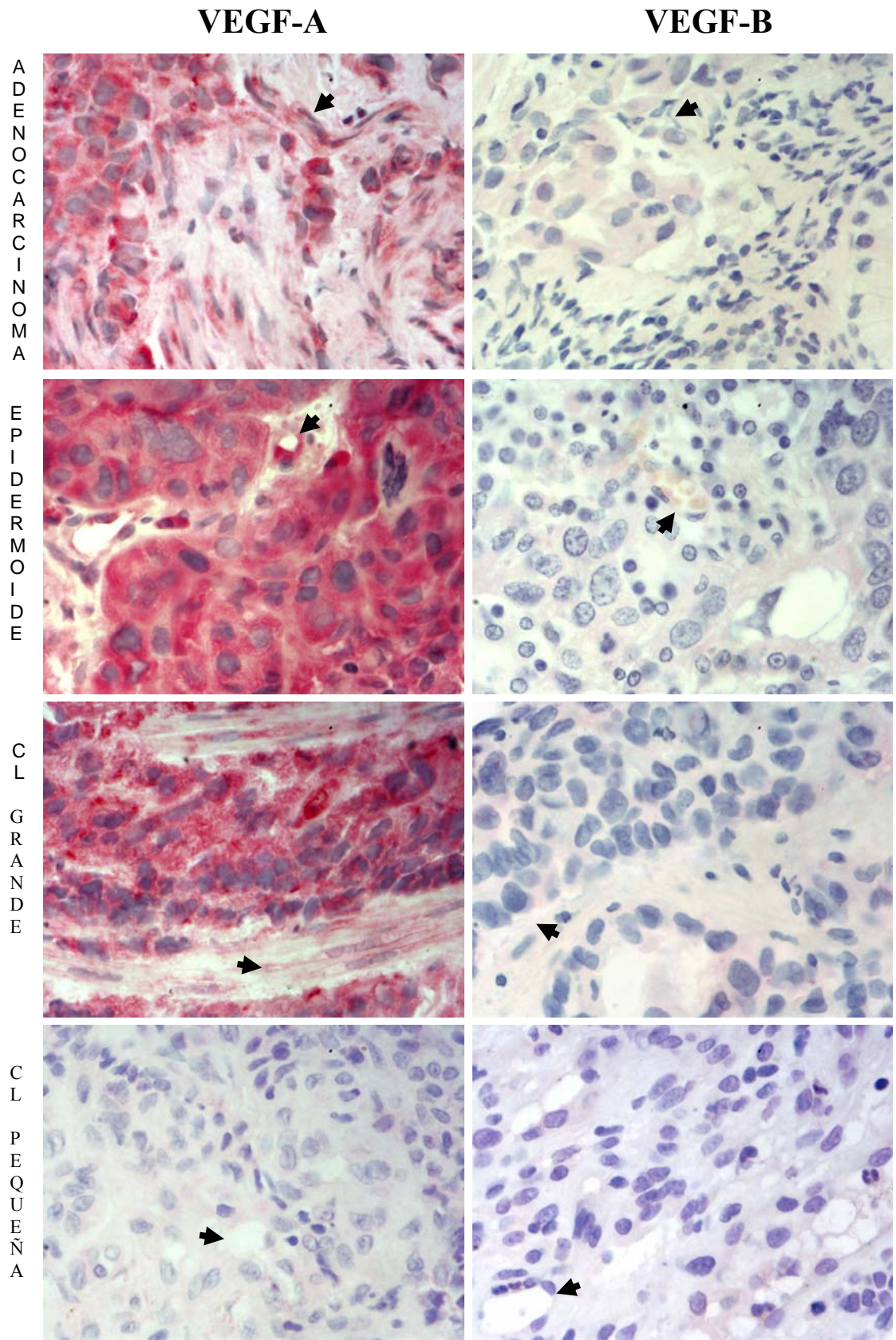
A reseñar que, en los tres pacientes en cuya muestra peritumoral había nichos tumorales, la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF fue la misma que la obtenida para sus correspondientes muestras de tejido tumoral, excepto en la muestra de un paciente donde se observó la expresión de VEGF-C en las células tumorales del tejido peritumoral, pero donde no se detectó en las células tumorales del tejido tumoral estudiado (tabla 31).

| Factores y Receptores<br>VEGF |                | Tipo Tejido         |                     |                     |                 |
|-------------------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
|                               |                | Parénquima alveolar |                     | Tumor               |                 |
|                               |                | Muestra Sana        | Muestra Peritumoral | Muestra Peritumoral | Muestra Tumoral |
| VEGF-A                        | Epitelio/tumor | 5/7                 | 5/7                 | 2/3                 | 2/3             |
|                               | Endotelio      | 7/7                 | 7/7                 | 2/3                 | 2/3             |
| VEGF-B                        | Epitelio/tumor | 0/7                 | 0/7                 | 2/3                 | 2/3             |
|                               | Endotelio      | 1/7                 | 0/7                 | 2/3                 | 2/3             |
| VEGF-C                        | Epitelio/tumor | 0/7                 | 0/7                 | 3/3                 | 2/3             |
|                               | Endotelio      | 0/7                 | 0/7                 | 1/3                 | 1/3             |
| VEGF-D                        | Epitelio/tumor | 7/7                 | 7/7                 | 3/3                 | 3/3             |
|                               | Endotelio      | 7/7                 | 7/7                 | 3/3                 | 3/3             |
| VEGFR1                        | Epitelio/tumor | 4/7                 | 4/7                 | 2/3                 | 2/3             |
|                               | Endotelio      | 5/7                 | 5/7                 | 1/3                 | 1/3             |
| VEGFR2                        | Epitelio/tumor | 1/7                 | 0/7                 | 2/3                 | 2/3             |
|                               | Endotelio      | 0/7                 | 0/7                 | 1/3                 | 1/3             |
| VEGFR3                        | Epitelio/tumor | 1/7                 | 1/7                 | 2/3                 | 2/3             |
|                               | Endotelio      | 0/7                 | 0/7                 | 1/3                 | 1/3             |

**Tabla 31.-** Comparación en la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF entre las muestras de tejido peritumoral y las muestras de tejido sano y tumoral.

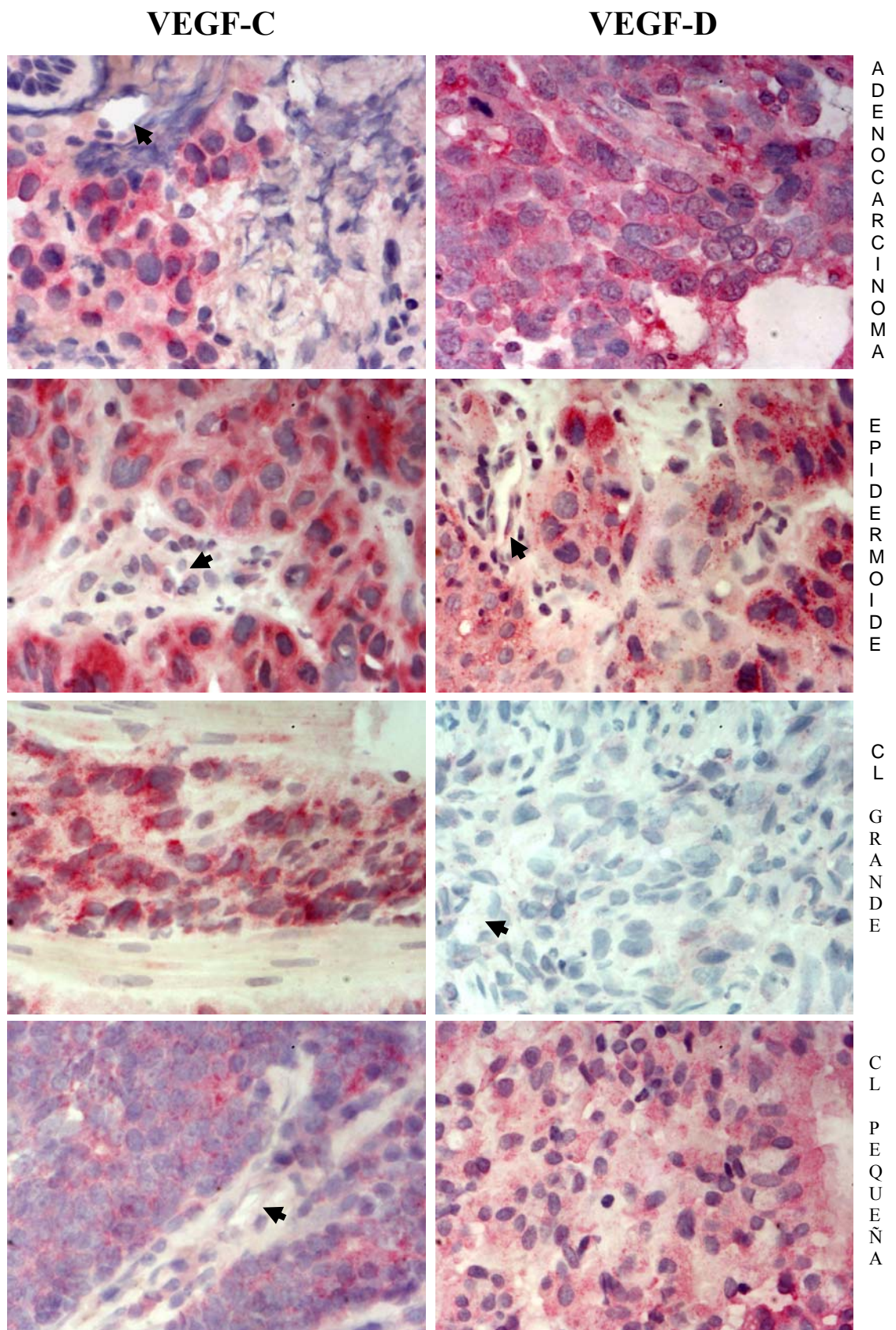






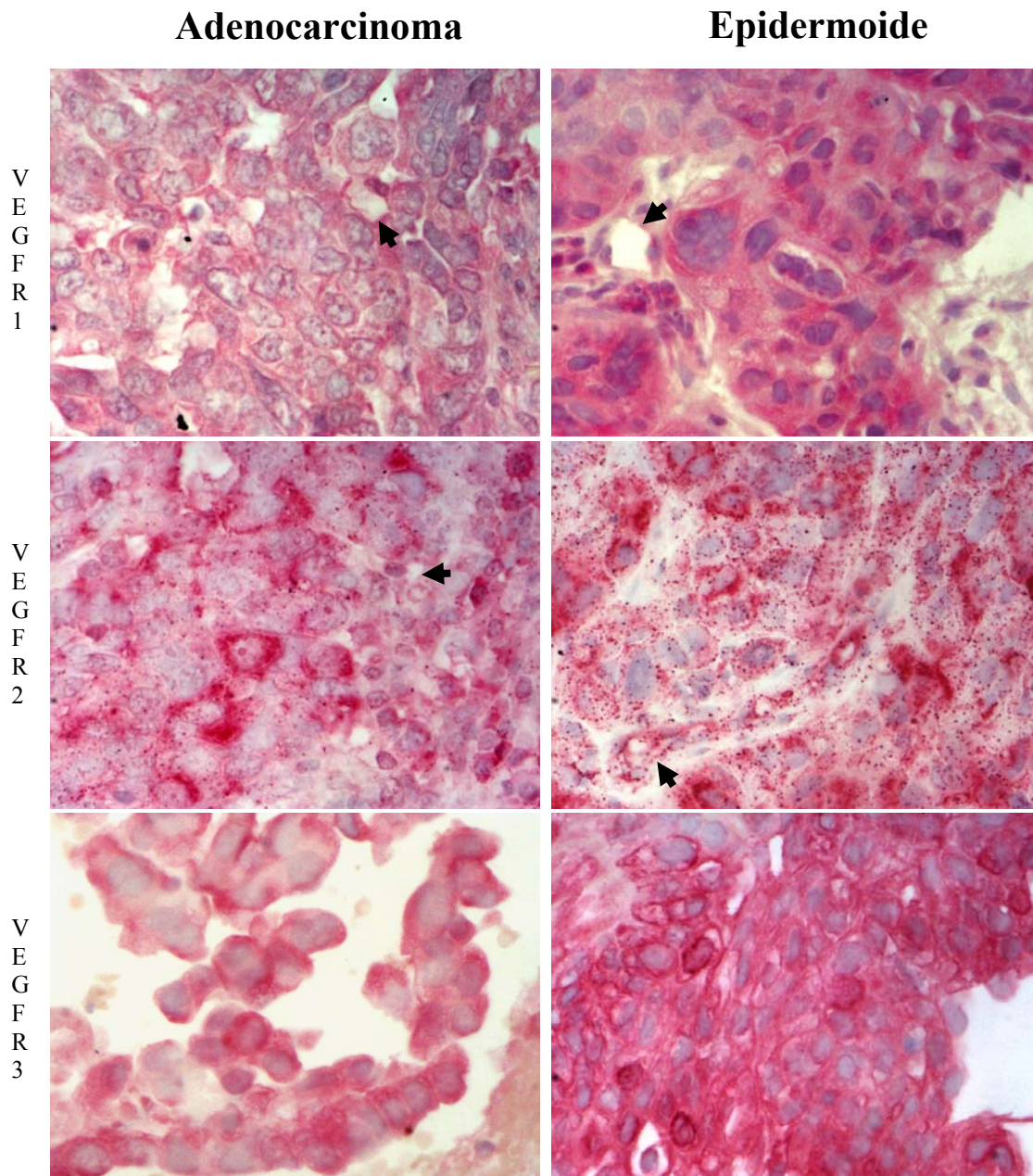
**Figura 34.-** Inmunohistoquímicas para VEGF-A y VEGF-B en muestras de tejido tumoral de las distintas estirpes histológicas del cáncer de pulmón (400x).

➡ Endotelio capilar.



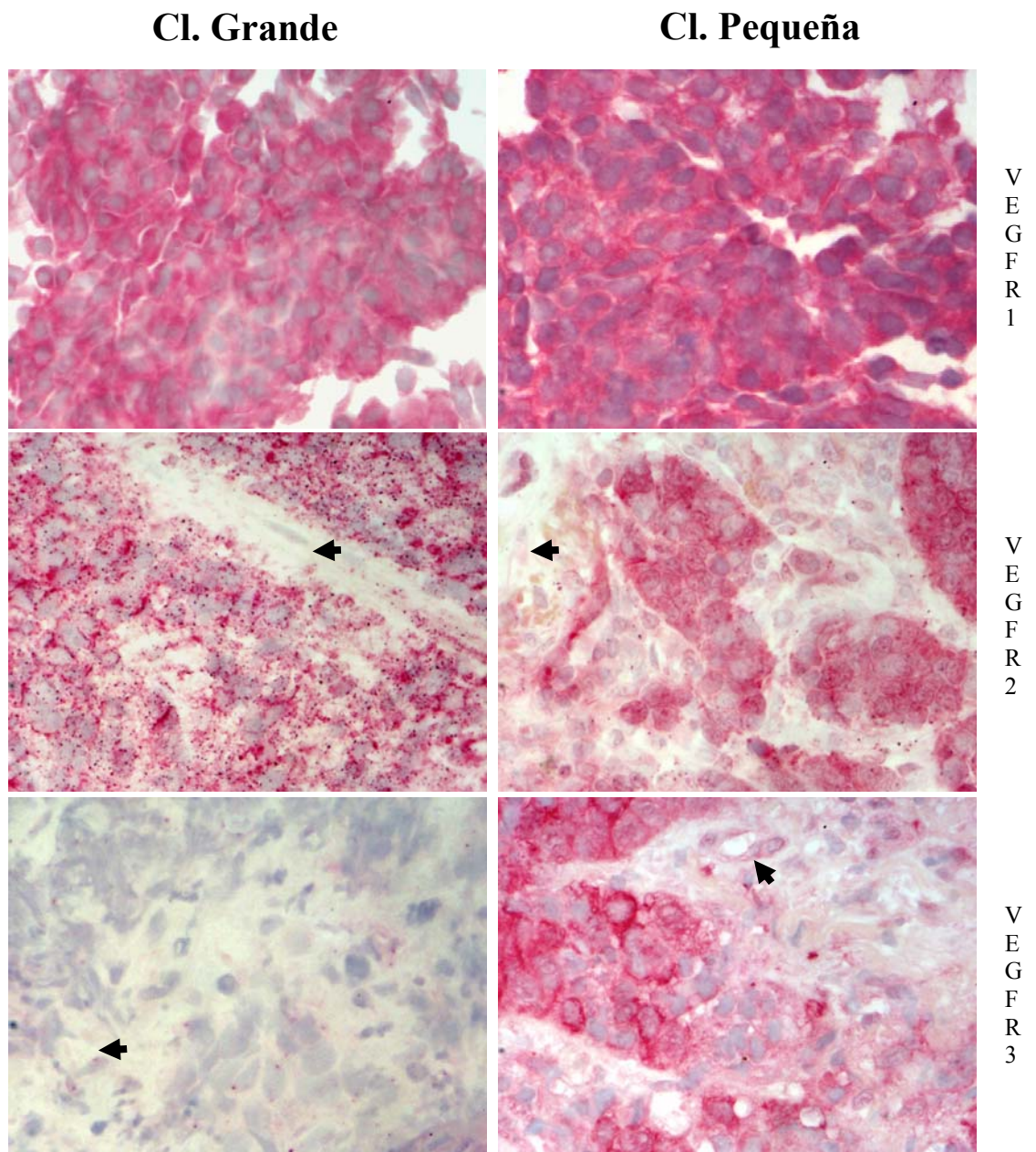
**Figura 35.-** Inmunohistoquímicas para VEGF-C y VEGF-D en muestras de tejido tumoral de las distintas estirpes histológicas del cáncer de pulmón (400x).

➡ Endotelio capilar.



**Figura 36.-** Inmunohistoquímicas para los VEGFRs en el adenocarcinoma y carcinoma epidermoide de pulmón (400x).

➡ Endotelio capilar.



**Figura 37.-** Inmunohistoquímicas para los VEGFRs en el carcinoma de células grandes y células pequeñas de pulmón.

➔ Endotelio capilar.

## 4.2 Estudio Inmunoenzimático

Al ser VEGF-A un factor soluble y con capacidad para difundir una vez secretado por las células tumorales<sup>64</sup>, se estudiaron los niveles de VEGF-A en el suero de 54 pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón y en 8 sueros control de personas sanas.

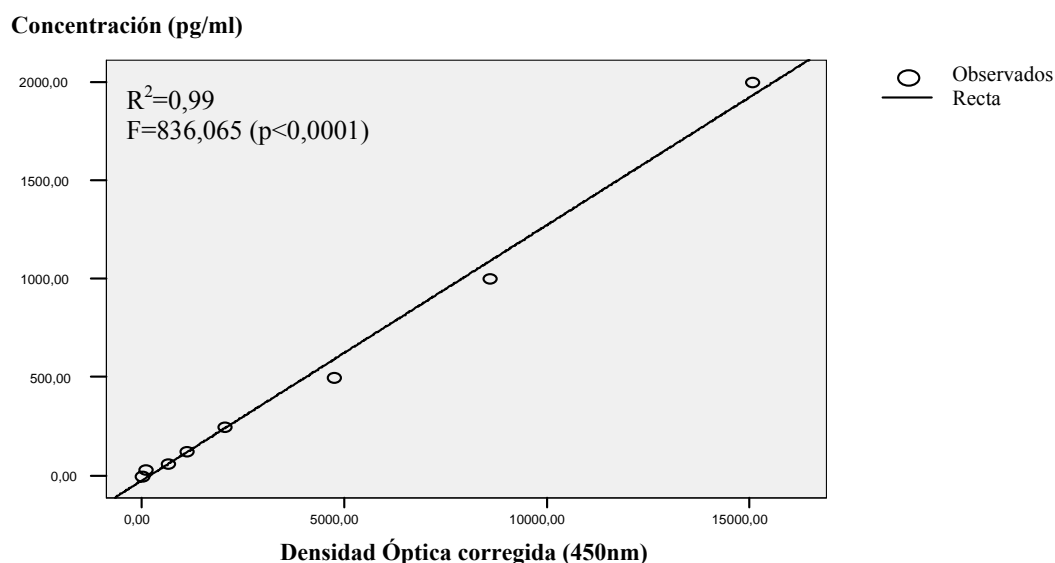
### 4.2.1 Control de la recta patrón

La recta patrón obtenida a partir de las concentraciones conocidas de los estándares y las densidades ópticas obtenidas para cada una de ellas, mostró un valor de 0,99 para el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y un valor de 836,065 para el estadístico F, lo que resultó ser significativo ( $p=1,13 \times 10^{-7}$ ). El coeficiente de determinación compara los valores estimados y reales de la concentración, fluctuando entre 0 y 1. Si es 1 existe una correlación perfecta en la muestra, no habiendo diferencia entre el valor de la concentración estimado y el valor real. Si el coeficiente de determinación es 0, la ecuación de regresión no es útil para predecir el valor de la concentración. El estadístico F determina si la relación observada entre la concentración y la densidad óptica ocurre aleatoriamente. Por lo tanto, la recta patrón que se ha obtenido muestra una correlación casi perfecta entre los valores de concentración estimados y los reales, indicando que la relación entre las concentraciones y las densidades ópticas no se dan de forma aleatoria (figura 38).

### 4.2.2 Población. Características clínicas y anatomopatológicas

Se estudiaron 54 pacientes asistidos por sospecha clínica y/o radiológica de cáncer de pulmón y pacientes sometidos a resección quirúrgica que no hubieran recibido radioterapia y/o quimioterapia previa. Cuarenta y nueve fueron varones (90,7%) y 5 mujeres (9,3%), con edades comprendidas entre los 41 y 92 años ( $67,57 \pm 11,44$ ). Cuarenta y ocho pacientes eran fumadores o ex-fumadores (94,1%) en el momento del diagnóstico. Solamente tres pacientes (5,9%) negaron tabaquismo activo durante su vida, aunque dos afirmaron ser fumadores pasivos en su domicilio y trabajo, en otros

tres pacientes se desconoce el hábito tabáquico en el momento del diagnóstico (tabla 32).



**Figura 38.-** Recta patrón.  
 $R^2$ .- Coeficiente de determinación;  $F$ .- Estadístico F.

Veintiocho pacientes presentaron la masa tumoral en el pulmón derecho (52,8%), con la siguiente distribución regional: 13 (24,5%) en el lóbulo superior, 4 (7,5%) en el lóbulo medio y 11 (20,8%) en el lóbulo inferior. Veinticuatro pacientes presentaron la masa tumoral en el pulmón izquierdo (45,3%), con la siguiente distribución regional: 14 (26,4%) en el lóbulo superior y 10 (18,9%) en el lóbulo inferior, además 1 paciente (1,9%) presentó el tumor de manera difusa y en otro de los pacientes estudiados no se dispone del dato de la localización del tumor. El tamaño de los tumores en los 43 pacientes en los que se disponía de esta información, estuvo comprendido entre 1 y 10,5 centímetros ( $5,41 \pm 2,65$ ) (tabla 32).

Once pacientes presentaron tumores de células pequeñas (20,8%) y 42 pacientes tumores de la estirpe no microcítico (79,3%): 11 de tipo adenocarcinoma (20,8%), 24 del tipo epidermoide (45,3%) y 7 del tipo células grandes (13,2%). En un paciente se desconoce esta información, al no poderse realizar la broncoscopia y llegar al diagnóstico mediante criterios clínico-radiológicos. Doce pacientes (22,6%) se clasificaron como estadio I, 3 (5,7%) como estadio II, 23 (43,4%) como estadio III y 15 (28,3%) como estadio IV. En 1 no se dispone de esta información (tabla 32).

| Características poblacionales |                  | Pacientes       | Porcentaje |      |
|-------------------------------|------------------|-----------------|------------|------|
| Sexo                          | Varón            | 49              | 90,7       |      |
|                               | Mujer            | 5               | 9,3        |      |
| Edad<br>67,57±11,4 años       | ≤67 años         | 25              | 46,3       |      |
|                               | >67 años         | 29              | 53,7       |      |
| Hábito tabáquico              | Fumador          | 21              | 41,2       |      |
|                               | Ex-fumador       | 27              | 52,9       |      |
|                               | No fumador       | 3               | 5,9        |      |
| Características radiológicas  |                  | Pacientes       | Porcentaje |      |
| Localización                  | Pulmón derecho   | Lóbulo superior | 13         | 24,5 |
|                               |                  | Lóbulo medio    | 4          | 7,5  |
|                               |                  | Lóbulo inferior | 11         | 20,8 |
|                               | Pulmón izquierdo | Lóbulo superior | 14         | 26,4 |
|                               |                  | Lóbulo inferior | 10         | 18,9 |
| Tamaño<br>5,4±2,6cm           | ≤ 5,4cm          | 26              | 60,5       |      |
|                               | > 5,4cm          | 17              | 39,5       |      |
| Características patológicas   |                  | Pacientes       | Porcentaje |      |
| Estirpe histológica           | Adenocarcinoma   | 11              | 20,8       |      |
|                               | Epidermoide      | 24              | 45,3       |      |
|                               | Células grandes  | 7               | 13,2       |      |
|                               | Células pequeñas | 11              | 20,8       |      |
| Estadio                       | I                | 12              | 22,6       |      |
|                               | II               | 3               | 5,7        |      |
|                               | III              | 23              | 43,4       |      |
|                               | IV               | 15              | 28,3       |      |

**Tabla 32.-** Características demográficas-clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio inmunoenzimático.

### 4.2.3 Estudio de la cuantificación de VEGF-A en suero

La cuantificación de VEGF-A en suero mostró que los casos controles tenían niveles más bajos de VEGF-A que los casos estudiados de cáncer de pulmón,  $132,07 \pm 84,77$  pg/ml frente a  $434,93 \pm 403,91$  pg/ml respectivamente ( $p < 0,05$ , U-Mann-Whitney) (tabla 33). El valor de la concentración de VEGF-A en el suero de uno de los pacientes se salió fuera de rango, por lo que no se incluyó en los estudios de concentración.

| Características clínico-patológicas |                         | Concentración media VEGF-A (pg/ml) | Desviación estándar | Mínimo | Máximo  | p-valor <sup>‡</sup> |
|-------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|---------------------|--------|---------|----------------------|
| <b>Controles (n=8)</b>              |                         | 132,07                             | 84,77               | 9,85   | 267,1   | 0,017*               |
| <b>Tumores (n=53)</b>               |                         | 434,93                             | 403,91              | 28,62  | 1609,61 |                      |
| <b>Edad</b>                         | ≤ 67 años (n=25)        | 467,42                             | 460,56              | 28,62  | 1609,61 | 0,986                |
|                                     | > 67 años (n=28)        | 405,92                             | 351,86              | 73,86  | 1319,09 |                      |
| <b>Localización</b>                 | LSD (n=13)              | 421,13                             | 469,34              | 87,77  | 1609,61 | 0,927                |
|                                     | LMD (n=4)               | 575,25                             | 553,38              | 151,6  | 1372,52 |                      |
|                                     | LID (n=10)              | 298,4                              | 142,16              | 90,92  | 549,43  |                      |
|                                     | LSI (n=14)              | 489,55                             | 434,3               | 28,62  | 1319,09 |                      |
|                                     | LII (n=10)              | 460,32                             | 455,37              | 38,17  | 1271,87 |                      |
| <b>Tamaño</b>                       | ≤ 5,4 cm (n=25)         | 326,72                             | 317,5               | 28,62  | 1271,87 | 0,056                |
|                                     | > 5,4 cm (n=27)         | 560,47                             | 426,83              | 73,86  | 1372,52 |                      |
| <b>Estirpe histológica</b>          | Adenocarcinoma (n=11)   | 455,96                             | 414,97              | 56,08  | 1609,61 | 0,696                |
|                                     | Epidermoide (n=23)      | 432,18                             | 393,62              | 52,05  | 1276,52 |                      |
|                                     | Células Grandes (n=7)   | 419,28                             | 414                 | 134,34 | 1309,19 |                      |
|                                     | Células Pequeñas (n=11) | 369,06                             | 427,35              | 28,62  | 1372,52 |                      |
| <b>Estadio</b>                      | I-II (n=14)             | 227,05                             | 156,67              | 38,17  | 549,43  | 0,037*               |
|                                     | III-IV (n=38)           | 517,59                             | 442,54              | 28,62  | 1609,61 |                      |

**Tabla 33.-** Niveles de VEGF-A en suero respecto a las características clínico-patológicas.

<sup>‡</sup> Se aplicó el test U-Mann-Whitney para el análisis de los casos controles frente a los tumores, la edad, el tamaño tumoral y el estadio. Se aplicó el test Kruskal-Wallis para la localización tumoral y la estirpe histológica.

\*  $p < 0,05$

El estudio de las características clínico-patológicas mostró ser estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ , U-Mann-Whitney) sólo para el estadio, donde se observó que los pacientes con estadios avanzados (III-IV) tenían niveles más altos de VEGF-A en suero que aquellos que presentaban enfermedad localizada (I-II),  $517,59 \pm 442,54$  pg/ml frente a  $227,05 \pm 156,67$  pg/ml, respectivamente.



Aunque el tamaño tumoral no resultó ser estadísticamente significativo, la diferencia de los niveles de VEGF-A en suero entre los tumores mayores y menores de 5,4 cm se aproxima a la significación estadística ( $p=0,05$ , U-Mann-Whitney). Los tumores mayores de 5,4 cm presentaron unos niveles de VEGF-A en suero de  $560,47 \pm 426,83$  pg/ml frente a  $326,72 \pm 317,5$  pg/ml de los tumores menores de 5,4 cm (tabla 33).

| Características Clínico-patológicas |                     | Número de Casos (Fallecidos/totales) | p-valor ( $\chi^2$ ) | Media $\pm$ Std. Error | p-valor (Log-Rank) |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------|
| Pacientes                           | Fallecidos          | 28/45 (62,2%)                        | $p=0,101$            | 10,317 $\pm$ 6,71      |                    |
|                                     | Vivos               | 17/45 (37,8%)                        |                      |                        |                    |
| Edad                                | $\leq 67$ años      | 12/21 (57,1%)                        | $p=0,727$            | 16,163 $\pm$ 1,83      | $p=0,571$          |
|                                     | $> 67$ años         | 16/24 (66,6%)                        |                      | 15,154 $\pm$ 1,77      |                    |
| Tamaño                              | $\leq 5,4$ cm       | 10/24 (41,6%)                        | $p=0,004^*$          | 20,067 $\pm$ 1,43      | $p=0,00001^*$      |
|                                     | $> 5,4$ cm          | 14/15 (93,3%)                        |                      | 8,807 $\pm$ 1,62       |                    |
| Estirpe Histológica                 | Adenocarcinoma      | 5/8 (62,5%)                          | $p=0,563$            | 17,554 $\pm$ 2,6       | $p=0,86$           |
|                                     | Epidermoide         | 11/21 (52,3%)                        |                      | 14,951 $\pm$ 2,04      |                    |
|                                     | C. Grandes          | 5/7 (71,4%)                          |                      | 16,114 $\pm$ 2,83      |                    |
|                                     | C. Pequeñas         | 7/9 (77,8%)                          |                      | 15,104 $\pm$ 2,68      |                    |
| TNM                                 | Estadio I-II        | 3/15 (20%)                           | $p=0,0001^*$         | 23,62 $\pm$ 0,501      | $p=0,00001^*$      |
|                                     | Estadio III-IV      | 25/30 (83,3%)                        |                      | 11,628 $\pm$ 1,419     |                    |
| VEGF-A (Suero)                      | $\leq 434,93$ pg/ml | 14/28 (50%)                          | $p=0,031^*$          | 17,231 $\pm$ 1,62      | $p=0,017^*$        |
|                                     | $> 434,93$ pg/ml    | 14/16 (87,5%)                        |                      | 12,269 $\pm$ 1,88      |                    |

**Tabla 34.-** Análisis de la supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio inmunoenzimático.

\*  $p < 0,05$  Log-Rank (Mantel-Cox).

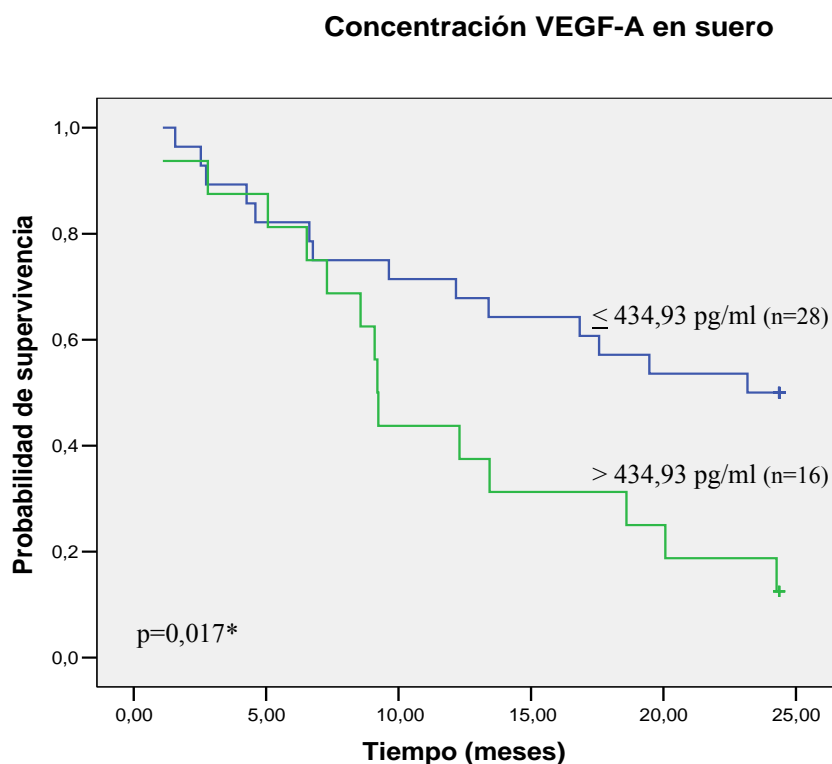
#### 4.2.4 Análisis de la supervivencia

El análisis de la supervivencia se realizó en 45 pacientes sobre los que se pudo obtener información referente a su estado vital después de dos años desde la fecha del diagnóstico. En el anexo III se muestran las tablas de supervivencia.

Veintiocho pacientes (62,2%) habían fallecido, mientras que sólo 17 (37,8%) continuaban con vida pasado este tiempo. La media de supervivencia entre los pacientes fallecidos fue de  $10,3 \pm 6,7$  meses (tabla 34).

## 4.2.4.1 Análisis de la supervivencia según la cuantificación de VEGF-A en suero

Catorce (87,5%) de los 16 pacientes con niveles superiores de 434,93 pg/ml de VEGF-A en suero habían fallecido al cabo de dos años desde la fecha del diagnóstico, lo que resultó ser estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ), en comparación con los 14 (50%) fallecidos de los 28 pacientes con niveles inferiores de 434,93 pg/ml. Se observó que el tiempo de supervivencia media disminuía en aquellos pacientes con concentraciones de VEGF-A en suero superiores de 434,93 pg/ml ( $12,2 \pm 1,8$  meses), respecto a aquellos con concentraciones inferiores de 434,93 pg/ml ( $17,2 \pm 1,6$  meses) ( $p < 0,05$ , Log-Rank) (tabla 34 y figura 39).



**Figura 39.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la concentración de VEGF-A en suero.

\*  $p < 0,05$  Log-Rank (Mantel-Cox)

#### 4.2.4.2 Análisis de la supervivencia según la edad y el tamaño del tumor

Doce (57,1%) de 21 pacientes menores de 67 años y 16 (66,6%) de 24 pacientes mayores de 67 años habían fallecido pasados dos años desde la fecha de diagnóstico ( $p > 0,05$ ,  $\chi^2$ ) (tabla 34 y figura 40). La estratificación de los pacientes mayores de 67 años según la cuantificación de VEGF-A en suero mostró que, aquellos pacientes con concentraciones mayores de 434,93 pg/ml tenían una supervivencia inferior ( $11,9 \pm 2,4$  meses), frente a los que presentaban niveles inferiores de 434,93 pg/ml ( $16,5 \pm 2,4$  meses) ( $p < 0,05$ , Log-Rank) (tabla 35 y figura 41).

Diez (41,6%) de 24 pacientes con tumores menores de 5,4 centímetros y 14 (93,3%) de 15 pacientes con tumores mayores de 5,4 centímetros habían fallecido pasados dos años desde la fecha de diagnóstico. La media de la supervivencia resultó ser superior en los pacientes que presentaron tumores menores de 5,4 centímetros ( $20 \pm 1,4$  meses), respecto a los pacientes con tumores mayores de 5,4 centímetros ( $8,8 \pm 1,6$  meses). Estas diferencias en la probabilidad y en el tiempo medio de supervivencia resultaron ser estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$  y Log-Rank) (tabla 34 y figura 42).

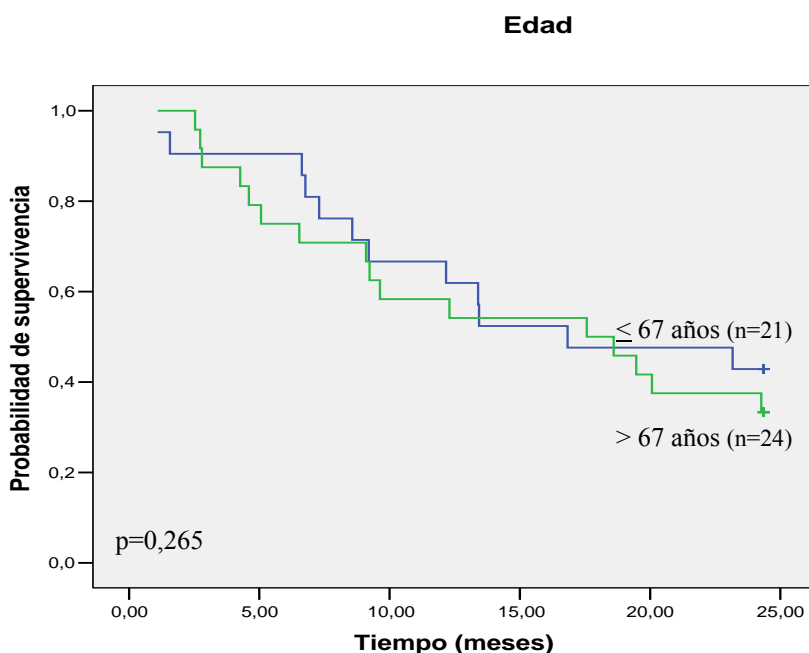
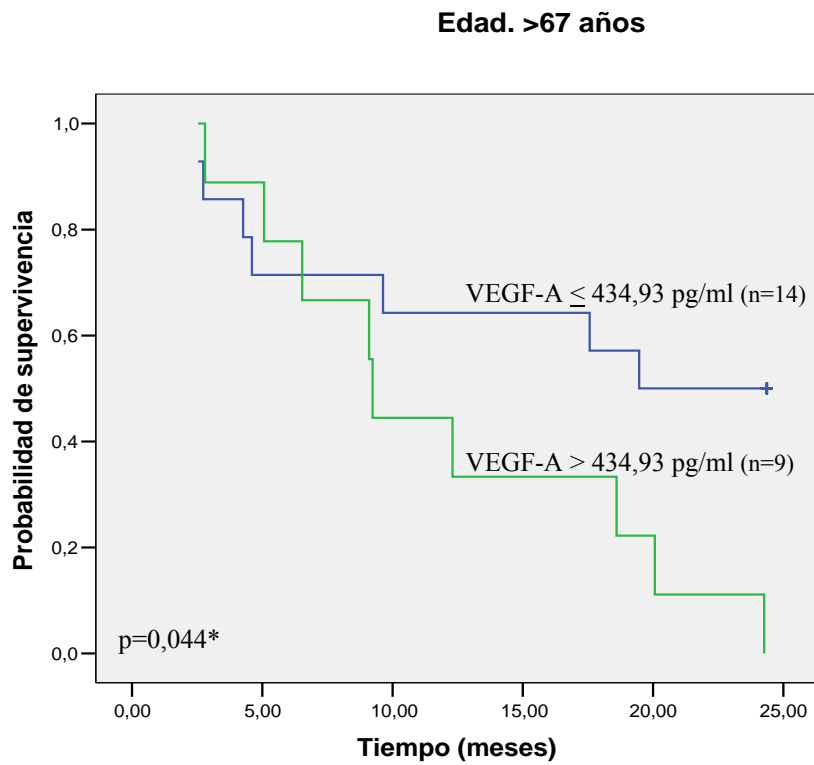
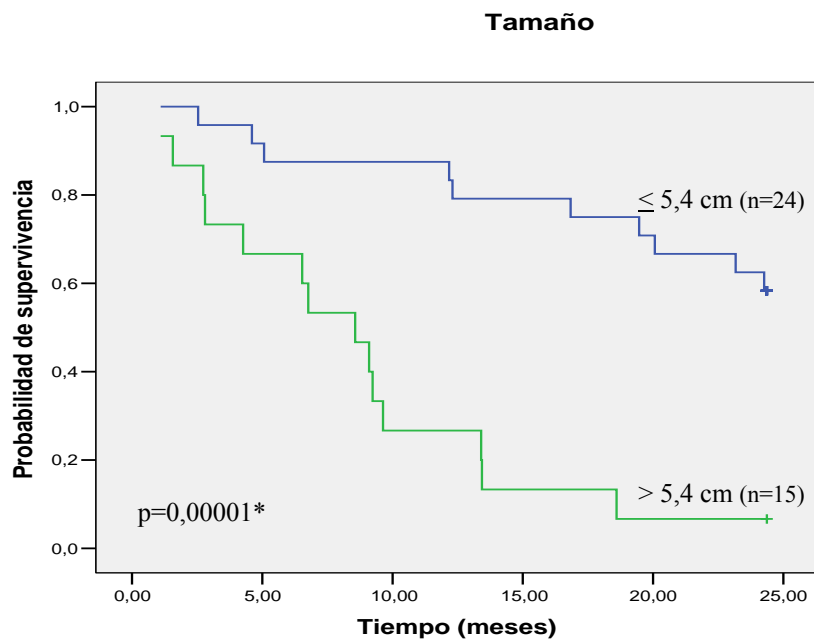


Figura 40.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la edad.



**Figura 41.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) en pacientes mayores de 67 años, según la concentración de VEGF-A en suero.  
\* p<0,05 Log-Rank (Mantel-Cox)



**Figura 42.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el tamaño del tumor.  
\* p<0,05 Log-Rank (Mantel-Cox)

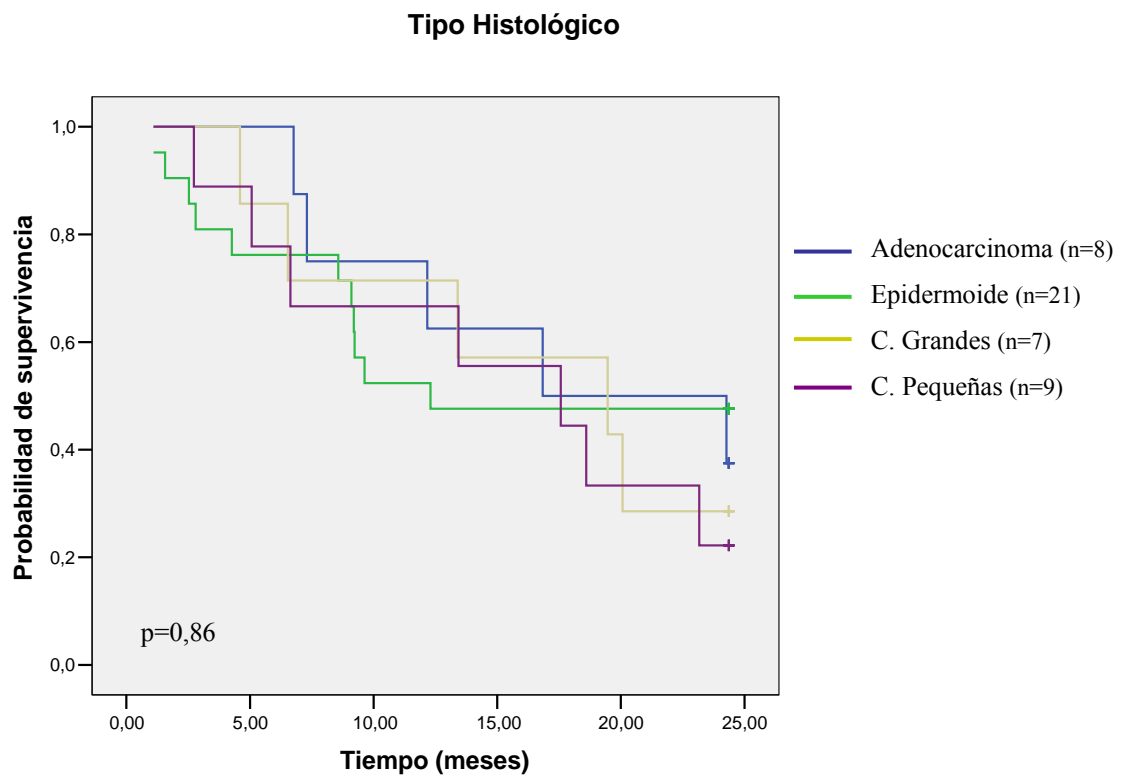
4.2.4.3 Análisis de la supervivencia según el tipo histológico

El análisis de la supervivencia en las distintas estirpes histológicas no mostró diferencias estadísticamente significativas en la probabilidad ( $p > 0,05$ ,  $\chi^2$ ) ni en el tiempo medio de supervivencia ( $p > 0,05$ , Log-Rank) (tabla 34 y figura 43). Sin embargo, al estratificar según la cuantificación de VEGF-A en el suero de los pacientes con tumores del tipo no microcítico, se observó que, la supervivencia en aquellos pacientes con concentraciones mayores de 434,93 pg/ml disminuía (12,2±2,1 meses), respecto a aquellos que presentaban niveles inferiores de 434,93 pg/ml (17,4±1,8 meses) ( $p < 0,05$ , Log-Rank) (tabla 35 y figura 44).

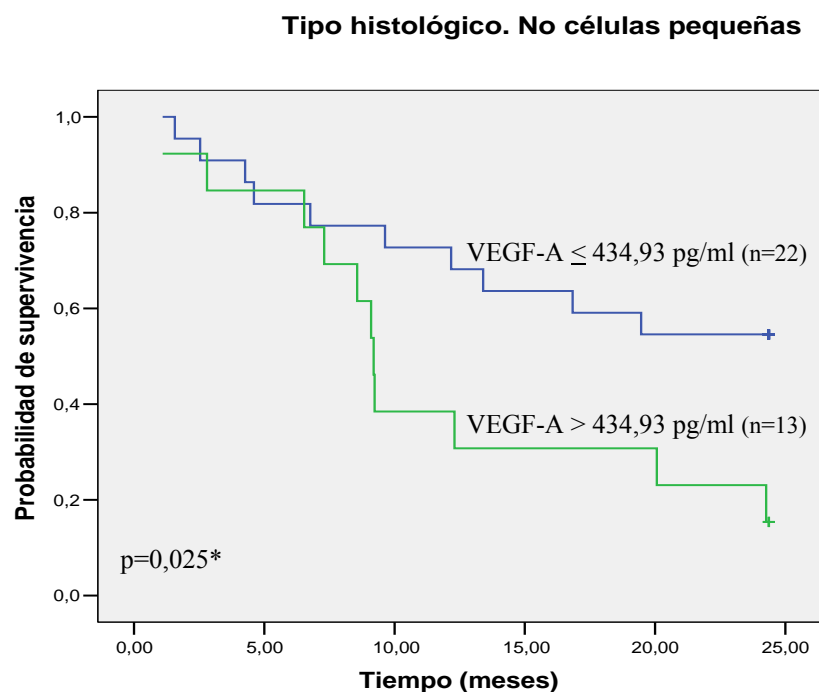
| Características Clínico-patológicas |                | Concentración VEGF-A (suero) | Número de Casos (Fallecidos/totales) | Media ±Std. Error | p-valor (Log-Rank) |
|-------------------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------|
| Edad                                | ≤ 67 años      | ≤ 434,93pg/ml                | 7/14 (50%)                           | 17,936±2,13       | p=0,265            |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 5/7 (71,4%)                          | 12,619±3,08       |                    |
|                                     | > 67 años      | ≤ 434,93pg/ml                | 7/14 (50%)                           | 16,526±2,43       | p=0,044*           |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 9/9 (100%)                           | 11,996±2,46       |                    |
| Tamaño                              | ≤ 5,4cm        | ≤ 434,93pg/ml                | 6/17 (35,2%)                         | 20,4±1,69         | p=0,255            |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 4/6 (66,6%)                          | 18,4±2,99         |                    |
|                                     | > 5,4cm        | ≤ 434,93pg/ml                | 6/7 (85,7%)                          | 8,962±2,77        | p=0,837            |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 8/8 (100%)                           | 8,671±1,97        |                    |
| Estirpe histológica                 | Adenocarcinoma | ≤ 434,93pg/ml                | 3/6 (50%)                            | 18,144±2,8        | p=0,366            |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 2/2 (100%)                           | 15,783±8,48       |                    |
|                                     | Epidermoide    | ≤ 434,93pg/ml                | 4/11 (36,3%)                         | 17,142±2,93       | p=0,108            |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 7/9 (77,7%)                          | 11,226±2,58       |                    |
|                                     | C. Grandes     | ≤ 434,93pg/ml                | 3/5 (60%)                            | 17,24±3,53        | p=0,549            |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 2/2 (100%)                           | 13,3±6,76         |                    |
|                                     | No Microcítico | ≤ 434,93pg/ml                | 10/22 (45,4%)                        | 17,438±1,82       | p=0,025*           |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 11/13 (84,6%)                        | 12,246±2,19       |                    |
| C. Pequeñas                         | ≤ 434,93pg/ml  | 4/6 (66,6%)                  | 16,472±3,56                          | p=0,27            |                    |
|                                     | > 434,93pg/ml  | 3/3 (100%)                   | 12,367±3,94                          |                   |                    |
| TNM                                 | Estadio I-II   | ≤ 434,93pg/ml                | 1/12 (8,3%)                          | 23,8±0,543        | p=0,005*           |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 2/2 (100%)                           | 22,167±2,100      |                    |
|                                     | Estadio III-IV | ≤ 434,93pg/ml                | 13/16 (81,2%)                        | 12,304±2,09       | p=0,661            |
|                                     |                | > 434,93pg/ml                | 12/14 (85,7%)                        | 10,855±1,85       |                    |

**Tabla 35.-** Análisis de la supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio inmunoenzimático según la concentración de VEGF-A en suero.

\*  $p < 0,05$  Log-Rank (Mantel-Cox)



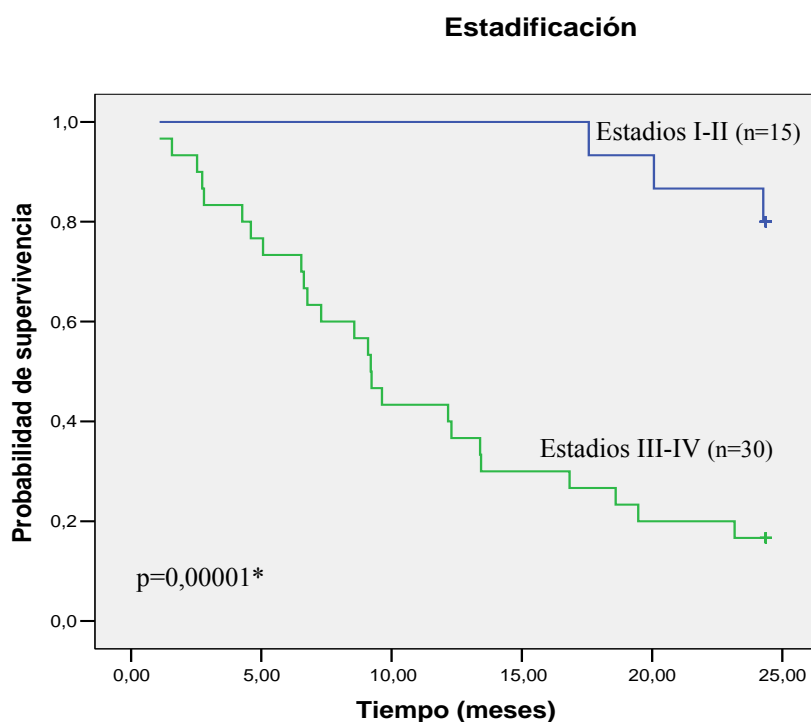
**Figura 43.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según el tipo histológico.



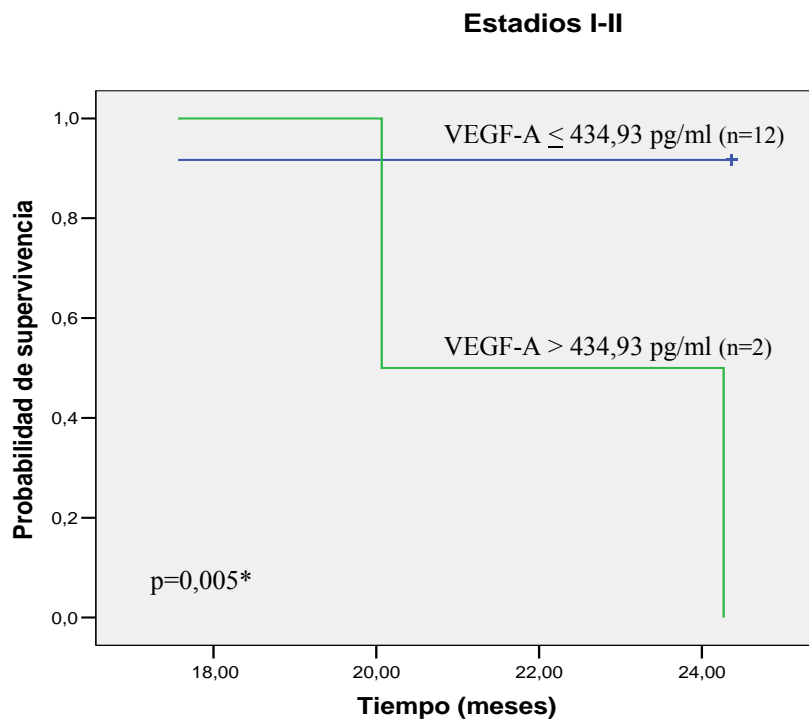
**Figura 44.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de pacientes con tumores de la estirpe no microcítico, según la concentración de VEGF-A en suero.  
\* p<0,05 Log-Rank (Mantel-Cox)

#### 4.2.4.4 Análisis de la supervivencia según la estadificación

Veinticinco (83,3%) de los 30 pacientes con tumores en estadios avanzados (III y IV) habían fallecido al cabo de dos años desde la fecha del diagnóstico, lo que resultó ser estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) en comparación con los 3 pacientes (20%) fallecidos de los 15 pacientes con enfermedad localizada (I y II). El tiempo medio de supervivencia resultó ser inferior en los estadios avanzados (III-IV:  $11,6 \pm 1,4$  meses) respecto de los estadios más iniciales (I-II:  $23,6 \pm 0,5$  meses) ( $p < 0,05$ , Log-Rank) (tabla 34 y figura 45). Además, al estratificar según la cuantificación de VEGF-A en el suero de los pacientes con tumores en estadios iniciales (I-II) se observó que, aquellos pacientes con niveles de VEGF-A superiores de 434,93 pg/ml tenían una supervivencia inferior ( $22,1 \pm 2,1$  meses), frente a los que presentaban niveles inferiores de 434,93 pg/ml ( $23,8 \pm 0,5$  meses) ( $p < 0,05$ , Log-Rank) (tabla 35 y figura 46).



**Figura 45.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) según la estadificación.  
\*  $p < 0,05$  Log-Rank (Mantel-Cox)



**Figura 46.-** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de pacientes con estadios I-II, según la concentración de VEGF-A en suero.

\* p<0,05 Log-Rank (Mantel-Cox)

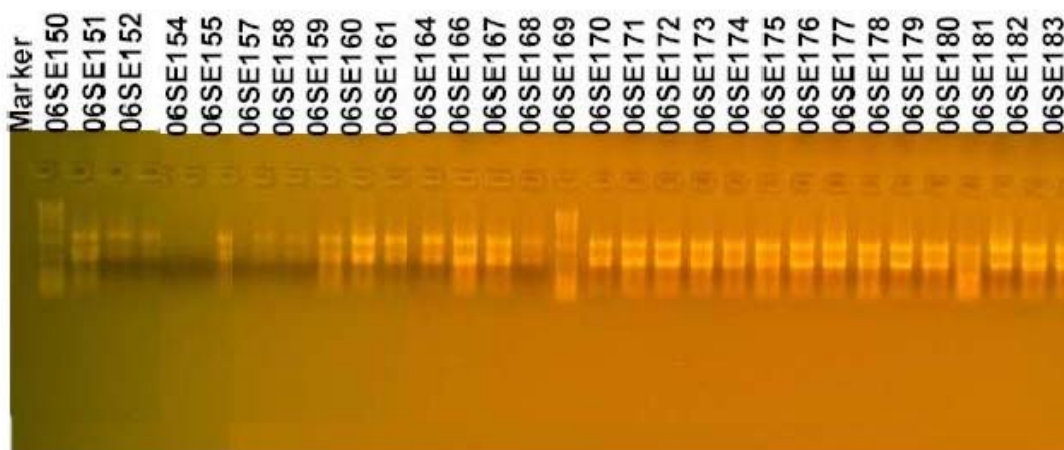


### 4.3 Estudio mediante *microarrays* de oligonucleótidos

Se estudiaron 29 muestras de 11 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón. Diez muestras de tejido sano del parénquima alveolar, 10 de tejido peritumoral y 9 muestras de tejido tumoral. El interés de seleccionar pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón obedece a la observación, en estudios previos, de que es el adenocarcinoma el tipo histológico que presenta mayor variabilidad en su comportamiento clínico y biológico<sup>297,299</sup>.

#### 4.3.1 Controles de calidad de las muestras de RNA

Antes de realizar los estudios de *microarrays*, todas las muestras de RNA extraídas de los distintos tipos de tejido, fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría, con el objetivo de asegurar la calidad de los ensayos y los resultados a analizar. Todas las muestras de RNA total extraído mostraron los valores de ratio ( $A_{260/280nm}$ ) dentro del rango óptimo (1,8-2,1) (tabla 36), y las características bandas del rRNA 18S y 28S que garantizaban la integridad del RNA (figura 47).



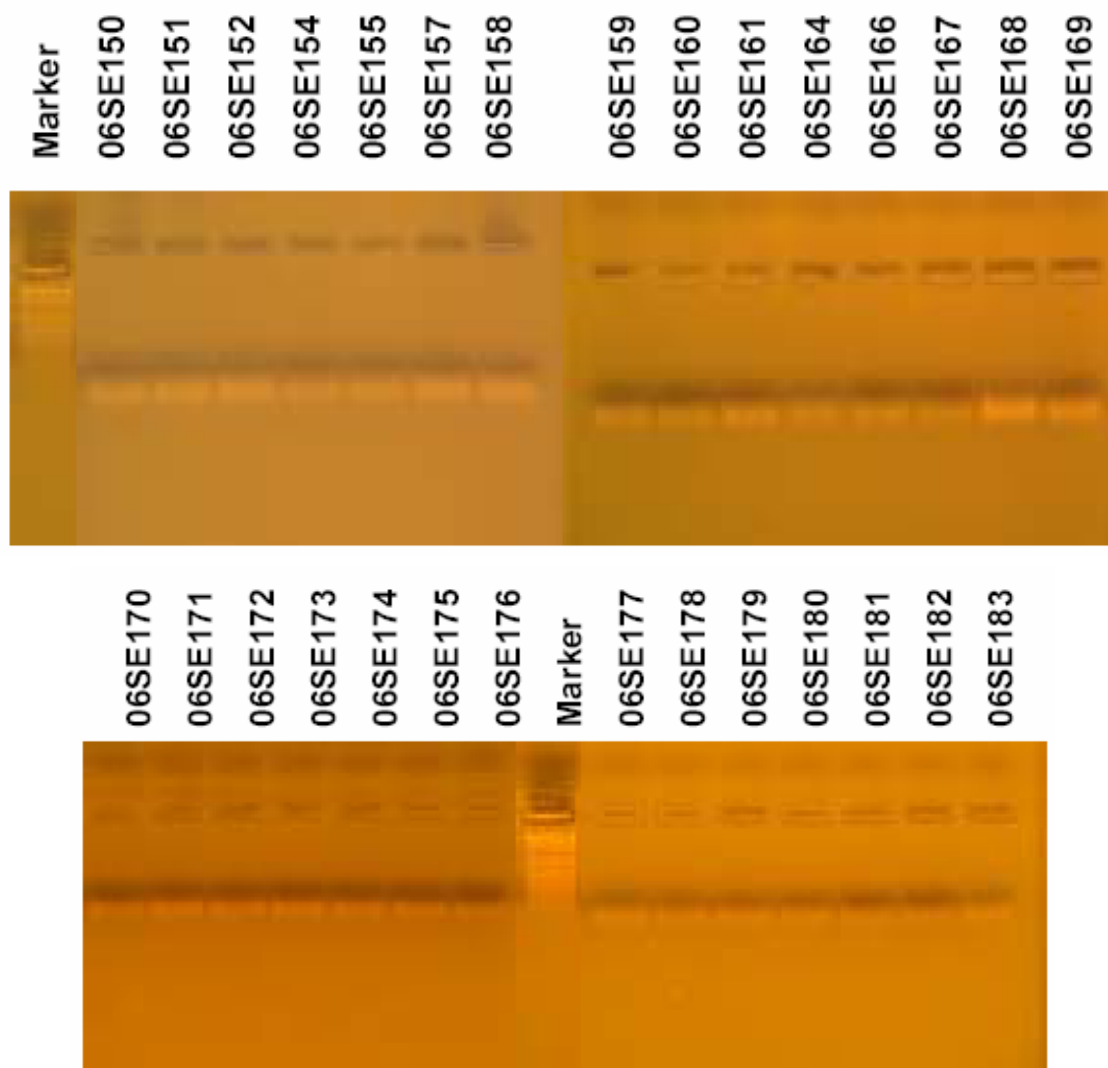
**Figura 47.-** Comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los RNAs purificados.

| Código Muestra* | Tipo tejido | Pureza ( $A_{260/280nm}$ ) |
|-----------------|-------------|----------------------------|
| 06SE150         | Tumoral     | 2,07                       |
| 06SE159         | Tumoral     | 2,11                       |
| 06SE164         | Tumoral     | 2,08                       |
| 06SE166         | Tumoral     | 2,10                       |
| 06SE169         | Tumoral     | 2,00                       |
| 06SE172         | Tumoral     | 2,07                       |
| 06SE175         | Tumoral     | 2,08                       |
| 06SE178         | Tumoral     | 2,08                       |
| 06SE181         | Tumoral     | 2,06                       |
| 06SE151         | Peritumoral | 2,04                       |
| 06SE154         | Peritumoral | 1,96                       |
| 06SE157         | Peritumoral | 2,11                       |
| 06SE160         | Peritumoral | 2,09                       |
| 06SE167         | Peritumoral | 2,08                       |
| 06SE170         | Peritumoral | 2,06                       |
| 06SE174         | Peritumoral | 2,07                       |
| 06SE176         | Peritumoral | 2,06                       |
| 06SE179         | Peritumoral | 2,05                       |
| 06SE182         | Peritumoral | 2,05                       |
| 06SE152         | Sano        | 2,07                       |
| 06SE155         | Sano        | 2,03                       |
| 06SE158         | Sano        | 1,93                       |
| 06SE161         | Sano        | 2,02                       |
| 06SE168         | Sano        | 2,06                       |
| 06SE171         | Sano        | 2,07                       |
| 06SE173         | Sano        | 2,06                       |
| 06SE177         | Sano        | 2,02                       |
| 06SE180         | Sano        | 2,07                       |
| 06SE183         | Sano        | 2,06                       |

**Tabla 36.-** Comprobación por espectrofotometría de la calidad de los RNAs purificados.

\*En rojo se muestran las muestras de tejido tumoral, en amarillo las muestras de tejido peritumoral y en azul las muestras de tejido sano.

Después de comprobar la integridad del RNA extraído, se lleva a cabo un segundo control de calidad para confirmar que el proceso de fragmentación de la muestra de cRNA se ha producido de manera uniforme. Si todo el proceso de fragmentación se ha llevado a cabo de forma óptima, debe observarse una banda de electroforesis limpia y homogénea, en caso contrario, se observa una mancha alargada correspondiente a RNA degradado o fragmentado de manera irregular. Todas las muestras de cRNA incluidas en este estudio mostraron, en la electroforesis, la banda de fragmentación homogénea (figura 48).



**Figura 48.-** Comprobación por electroforesis en gel de agarosa de los cRNAs fragmentados.

### 4.3.2 Análisis de los controles tras la hibridación y el escaneado de los arrays

La calidad de la hibridación se valoró mediante la presencia de los *spike controls* (*bioB*, *bioC*, *bioD* y *cre*) en la mezcla de hibridación y la relación 3'/5' del gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Se considera que el ratio 3'/5' es válido si su valor no es superior a 3; cuanto más próximo a 1 sea ese valor, mayor integridad existe en la muestra hibridada. En este estudio, los valores de ratio 3'/5', del gen GAPDH no fueron superiores a 3 en ningún caso y en su mayoría estuvieron muy próximos a 1, asegurando la calidad de las mismas. La hibridación de los controles internos empleados fue correcta en todos los experimentos. Los resultados obtenidos para los controles de hibridación, en todos los *arrays*, se muestran en la [tabla 37](#).

| Código Muestra* | Spike control bioB | Housekeeping GAPDH(3'/5') |
|-----------------|--------------------|---------------------------|
| 06SE150         | Presente           | 1,26                      |
| 06SE159         | Presente           | 1,24                      |
| 06SE164         | Presente           | 1,39                      |
| 06SE166         | Presente           | 1,20                      |
| 06SE169         | Presente           | 1,36                      |
| 06SE172         | Presente           | 2,38                      |
| 06SE175         | Presente           | 1,53                      |
| 06SE178         | Presente           | 1,34                      |
| 06SE181         | Presente           | 1,31                      |
| 06SE151         | Presente           | 1,20                      |
| 06SE154         | Presente           | 1,47                      |
| 06SE157         | Presente           | 1,24                      |
| 06SE160         | Presente           | 1,32                      |
| 06SE167         | Presente           | 1,29                      |
| 06SE170         | Presente           | 1,27                      |
| 06SE174         | Presente           | 1,70                      |
| 06SE176         | Presente           | 1,33                      |
| 06SE179         | Presente           | 1,39                      |
| 06SE182         | Presente           | 1,46                      |
| 06SE152         | Presente           | 1,29                      |
| 06SE155         | Presente           | 1,52                      |
| 06SE158         | Presente           | 1,11                      |
| 06SE161         | Presente           | 1,20                      |
| 06SE168         | Presente           | 1,04                      |
| 06SE171         | Presente           | 1,30                      |
| 06SE173         | Presente           | 2,00                      |
| 06SE177         | Presente           | 1,35                      |
| 06SE180         | Presente           | 1,64                      |
| 06SE183         | Presente           | 1,26                      |

**Tabla 37.-** Resultados de los controles de hibridación Bio B y ratio 3'/5' del gen GAPDH, de cada uno de los *arrays* analizados.

\*En rojo se muestran las muestras de tejido tumoral, en amarillo las muestras de tejido peritumoral y en azul las muestras de tejido sano.

En resumen, observadas las imágenes de cada uno de los *arrays* hibridados en el presente estudio y teniendo en cuenta los criterios de calidad (presencia de *spike controls* y relaciones 3'/5' del gen GAPDH), los 29 *arrays* hibridados superaron los criterios de calidad establecidos.

### 4.3.3 Perfiles de expresión génica diferencial en los tejidos sanos, peritumorales y tumorales

El análisis de la expresión génica diferencial de los resultados obtenidos mediante el algoritmo de detección (Material y métodos 3.2.4.3), entre los tres tipos de tejido estudiados, mostró que, en el tejido sano se expresaban 4.361 genes y no se encontraba expresión en 3.775. En el tejido peritumoral se expresaban 4.108 genes y no se expresaban 3.895, mientras que, en el tejido tumoral se expresaban 3.871 y no se expresaban 3.965 genes (tabla 38).

| Tipo de tejido     | Genes expresados | Genes no expresados |
|--------------------|------------------|---------------------|
| Tejido sano        | 4361             | 3775                |
| Tejido peritumoral | 4108             | 3895                |
| Tejido tumoral     | 3871             | 3965                |

**Tabla 38.-** Análisis global de la expresión génica diferencial entre los distintos tipos de tejidos.

De los 8.500 genes analizados, 258 se encontraron expresados en uno o dos de los tres tipos de tejido estudiados y no expresados en el otro. Expresados en el tejido sano y no expresados en el tejido peritumoral se encontraron 53 genes, en el tejido peritumoral se encontraron expresados 10 genes que no se expresaban en el tejido sano, expresados en el tejido sano y que no se expresaban en el tejido tumoral se encontraron 175 genes, en el tejido tumoral se expresaban 45 genes que no se expresaban en el tejido sano. Además, 66 genes se expresaron en el tejido peritumoral y no se expresaron en el tejido tumoral, mientras que en el tejido tumoral se expresaban 22 genes que no se expresaban en el tejido peritumoral (tabla 39).

Los listados completos con el nombre y el símbolo (según el NCBI *UniGene*<sup>333</sup>) de los genes diferencialmente expresados y no expresados observados en los estudios comparativos de *microarrays* entre los distintos tipos de tejidos, están desglosados en el anexo IV, para mayor comodidad en la lectura de esta memoria. En dicho anexo se incluyen las tablas generadas por el servidor FatiGO<sup>330</sup> correspondientes a los procesos biológicos en los que intervienen dichos genes, según la nomenclatura *Gene Ontology*<sup>331</sup> (nivel 5).

| Tipos de Tejido   | E <sub>(1)</sub> NE <sub>(2)</sub> * | NE <sub>(1)</sub> E <sub>(2)</sub> |
|---|--------------------------------------|------------------------------------|
| (1)T. Sano vs T. Peritumoral <sub>(2)</sub>                 | 53                                   | 10                                 |
| (1)T. Sano vs T. Tumoral <sub>(2)</sub>                     | 175                                  | 45                                 |
| (1)T. Peritumoral vs T. Tumoral <sub>(2)</sub>              | 66                                   | 22                                 |
| (1)T. Sano, (1)T. Peritumoral vs T. Tumoral <sub>(2)</sub>  | 58                                   | 14                                 |
| (1)T. Sano, (1)T. Tumoral vs T. Peritumoral <sub>(2)</sub>  | 3                                    | 1                                  |
| (1) T. Peritumoral, (1)T. Tumoral vs T. Sano <sub>(2)</sub> | 6                                    | 31                                 |

**Tabla 39.-** Análisis de expresión génica diferencial entre los distintos tipos de tejido estudiados.

\* Se indica el número de genes expresados (E) y no expresados (NE) al comparar cada tipo de tejido (1 y 2 en cada caso).

#### 4.3.4 Genes candidatos a marcadores tumorales

El análisis estadístico a partir de los valores de señal obtenidos desde los *microarrays*, con el objetivo de encontrar potenciales marcadores tumorales, mostró 24 genes con expresión diferencial estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA con corrección de Bonferroni) entre los tres tipos de tejido estudiados. El listado de estos genes se muestra en la [tabla 40](#).

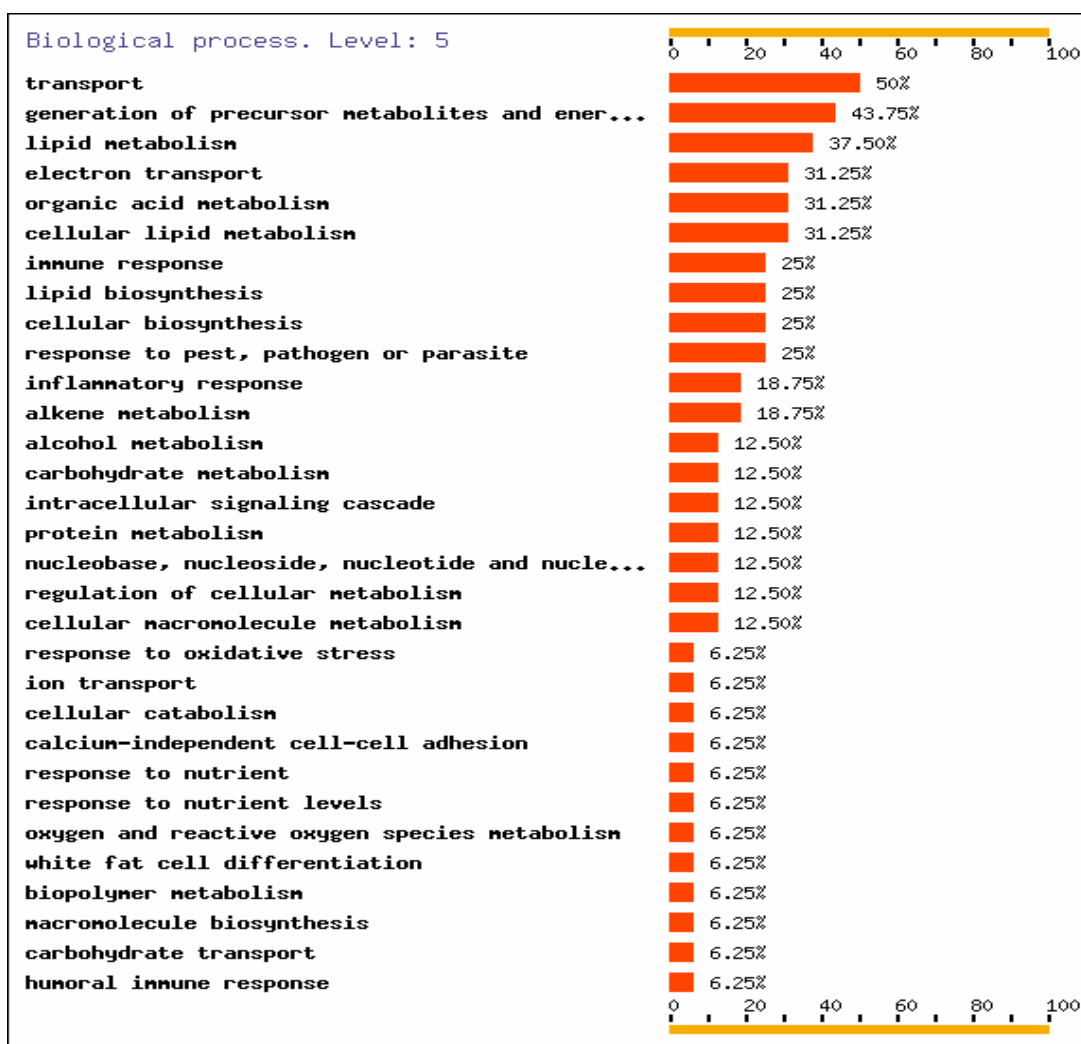
El análisis de los procesos biológicos en los que intervienen dichos genes y su localización celular, según la nomenclatura *Gene Ontology*<sup>331</sup> (nivel 5), se muestran en las [tablas 41](#) y [42](#) generadas por el servidor FatiGO<sup>330</sup>.

Observando la expresión media de los 24 genes seleccionados para los *microarrays* de cada tipo de tejido, se pudo comprobar que ésta era mayor en los *microarrays* de tejido sano respecto a los de tejido peritumoral y tumoral y, que la expresión media de los *microarrays* de tejido peritumoral era intermedia entre los de tejido sano y tejido tumoral ([figura 49](#)). Sólo el gen CKAP4 y el clon FLC1492 PRO3121 mRNA se encontraron sobreexpresados en el tejido tumoral respecto al tejido sano y peritumoral ([tabla 43](#)).

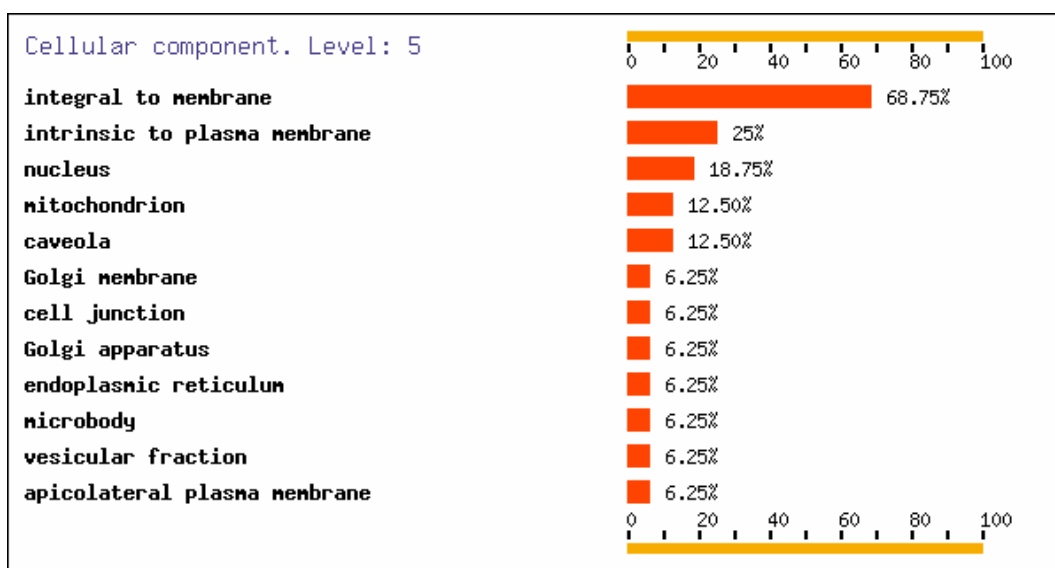
| Símbolo* | Nombre  |
|----------|---|
| ---      | Homo sapiens clone FLC1492 PRO3121 mRNA                             |
| ---      | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434C2112<br>(from clone DKFZp434C2112) |
| ACADL    | acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain                           |
| ALOX5    | arachidonate 5-lipoxygenase   |
| ALOX5AP  | arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein                      |
| ANXA3    | annexin A3  |
| AQP4     | aquaporin 4   |
| CAT      | catalase  |
| CAV1     | caveolin 1, caveolae protein, 22kDa                                 |
| CAV2     | Homo sapiens cDNA: FLJ20860 fis,<br>clone ADKA01632.                |
| CDW52    | CDW52 antigen (CAMPATH-1 antigen)                                   |
| CKAP4    | cytoskeleton-associated protein 4                                   |
| CLDN18   | claudin 18  |
| CLIC3    | chloride intracellular channel 3                                    |
| CYB5     | cytochrome b-5  |
| CYP51A1  | cytochrome P450, family 51, subfamily A,<br>polypeptide 1           |
| FBP1     | fructose-1,6-bisphosphatase 1                                       |
| HLF      | hepatic leukemia factor   |
| LTA4H    | leukotriene A4 hydrolase  |
| PPARG    | peroxisome proliferative activated receptor, gamma                  |
| RETN     | resistin  |
| SLC35A1  | solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter),<br>member 1 |
| STAC     | src homology three (SH3) and cysteine rich domain                   |
| TREM1    | triggering receptor expressed on myeloid cells 1                    |

**Tabla 40.-** Genes con expresión diferencial estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA con corrección de Bonferroni) entre los tres tipos de tejido estudiados.

\* Símbolo según el NCBI *UniGene*<sup>333</sup>



**Tabla 41.-** Procesos biológicos en los que interviene los genes seleccionados con expresión diferencial estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA con corrección de Bonferroni) entre los tres tipos de tejido estudiados, según el *Gene Ontology*<sup>331</sup> (nivel 5).



**Tabla 42.-** Localización celular de los genes seleccionados con expresión diferencial estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA con corrección de Bonferroni) entre los tres tipos de tejido estudiados, según el *Gene Ontology*<sup>331</sup> (nivel 5).



| Símbolo*                                   | T. sano/T. peritumoral <sup>†</sup> | T. sano/T. tumoral | T. peritumoral/T. tumoral |
|--|-------------------------------------|--------------------|---------------------------|
| Homo sapiens clone<br>FLC1492 PRO3121 mRNA | -1,077                              | -2,871             | -1,794                    |
| Homo sapiens mRNA;<br>cDNA DKFZp434C2112   | 0,419                               | 0,850              | 0,431                     |
| ACADL                                      | 0,831                               | 2,522              | 1,691                     |
| ALOX5                                      | 1,153                               | 1,597              | 0,444                     |
| ALOX5AP                                    | 1,225                               | 1,837              | 0,612                     |
| ANXA3                                      | 0,830                               | 2,626              | 1,796                     |
| AQP4                                       | 0,593                               | 2,791              | 2,198                     |
| CAT  | 0,631                               | 1,454              | 0,824                     |
| CAV1                                       | 0,811                               | 2,287              | 1,476                     |
| CAV2                                       | 0,918                               | 2,647              | 1,729                     |
| CDW52                                      | 0,967                               | 2,066              | 1,099                     |
| CKAP4                                      | -0,455                              | -1,339             | -0,885                    |
| CLDN18                                     | 1,030                               | 4,080              | 3,051                     |
| CLIC3                                      | 0,809                               | 2,796              | 1,987                     |
| CYB5                                       | 0,410                               | 1,638              | 1,228                     |
| CYP51A1                                    | 0,712                               | 1,045              | 0,333                     |
| FBP1                                       | 1,196                               | 2,001              | 0,805                     |
| HLF  | 1,198                               | 1,912              | 0,714                     |
| LTA4H                                      | 0,734                               | 1,382              | 0,648                     |
| PPARG                                      | 1,228                               | 2,258              | 1,030                     |
| RETN                                       | 1,370                               | 1,805              | 0,435                     |
| SLC35A1                                    | 0,466                               | 1,087              | 0,620                     |
| STAC                                       | 1,071                               | 1,830              | 0,759                     |
| TREM1                                      | 0,903                               | 1,683              | 0,780                     |

**Tabla 43.-** Valores de SLR para cada uno de los 24 genes seleccionados entre los tejidos estudiados.

\* Símbolo según el NCBI *UniGene*<sup>333</sup>

<sup>†</sup> SLR<sub>≤</sub>-1, reprimido; SLR<sub>≥</sub>1, sobreexpresado.

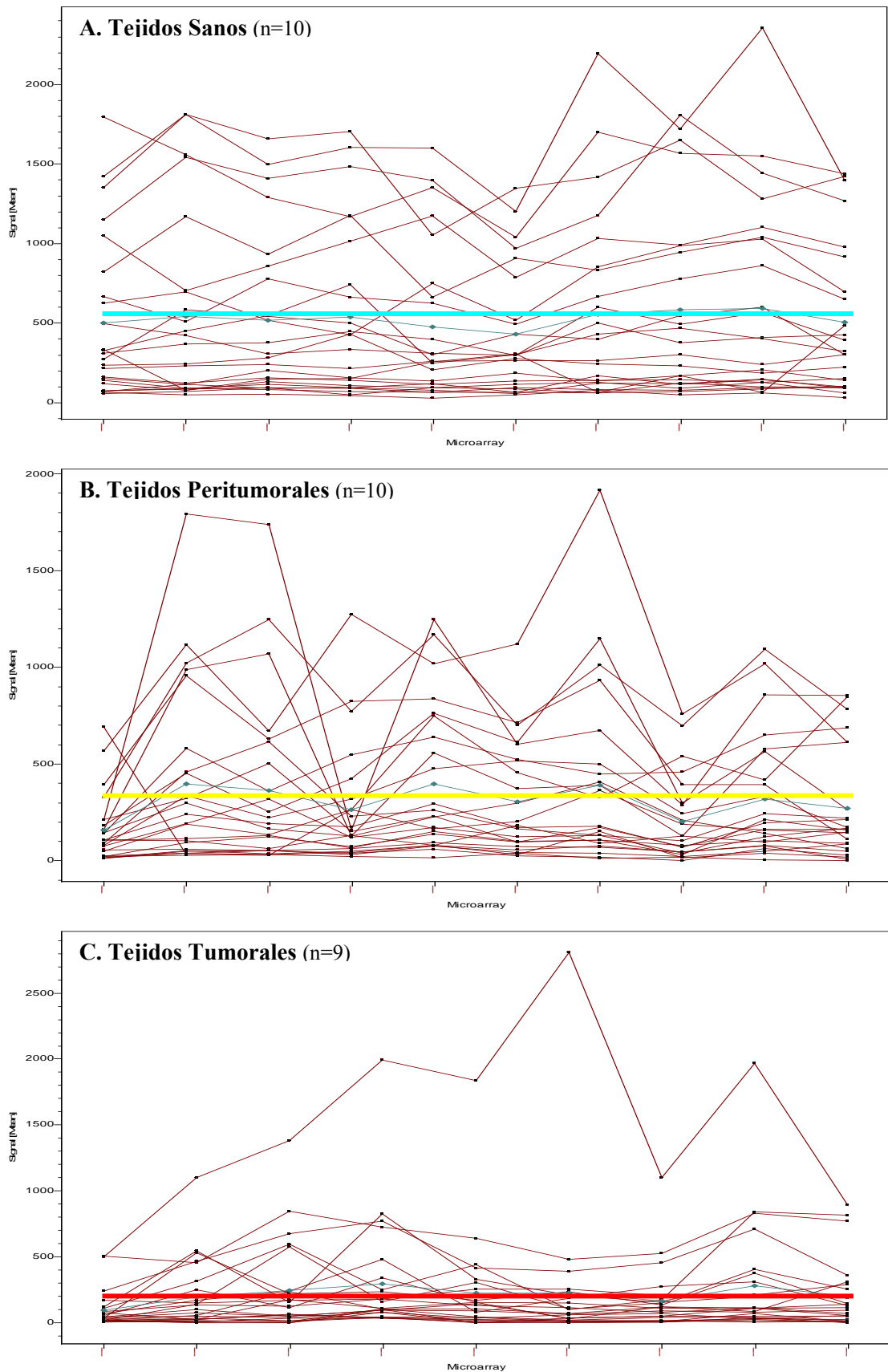
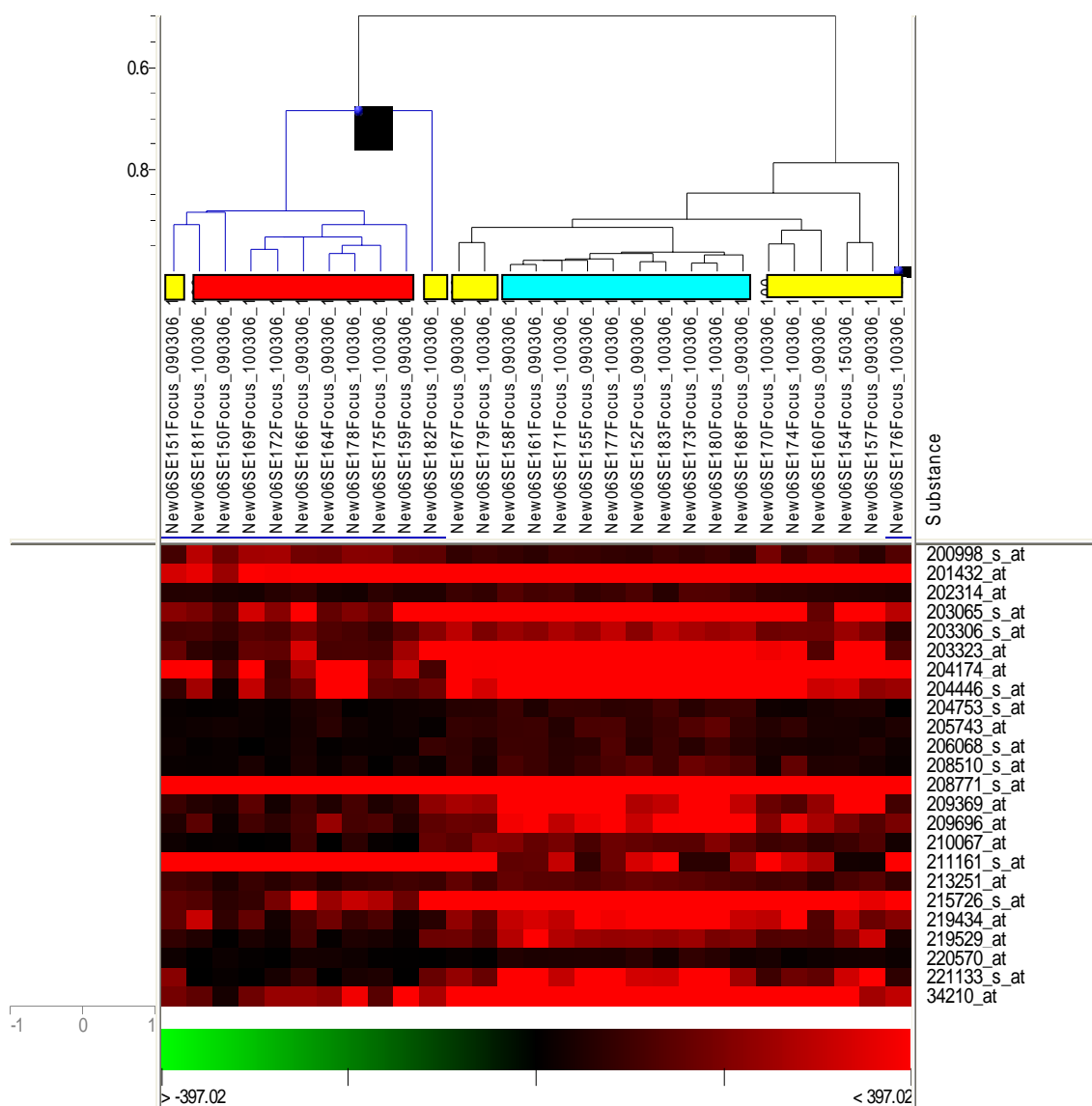


Figura 49.- Expresión media de los 24 genes seleccionados según el tipo de tejido.

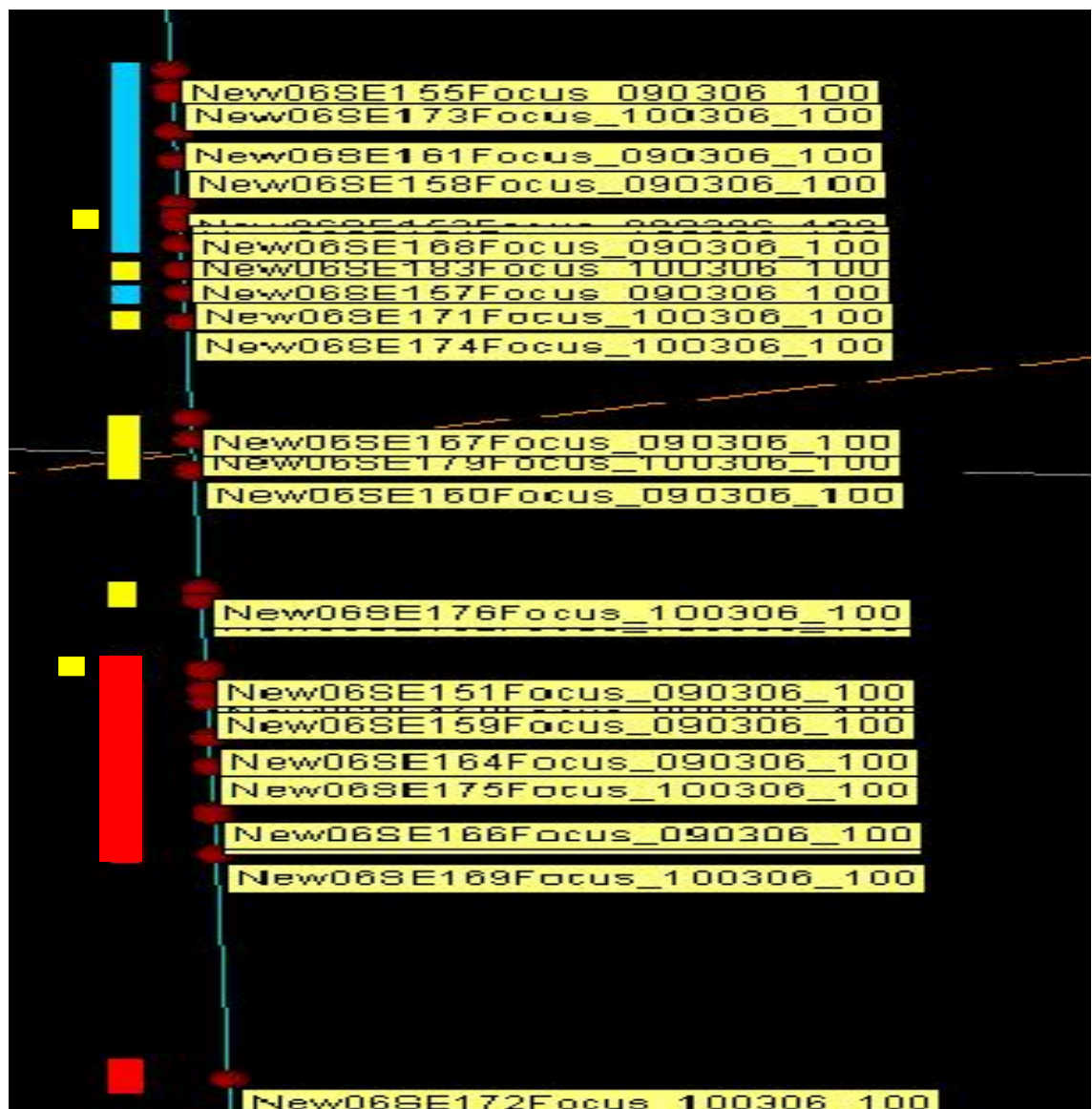
Una vez seleccionados estos 24 genes, se procedió a agrupar los 29 *microarrays* realizados, mediante los algoritmos de agrupamiento jerarquizado y análisis por componentes principales, según el perfil de expresión de dichos genes para cada *microarray*.

El agrupamiento jerarquizado mostró dos grupos de *microarrays* claramente separados, uno correspondiente a los de tejido tumoral y otro correspondiente a los de tejido sano. Los *microarrays* de tejido peritumoral se agruparon 2 en el grupo de los de tejido tumoral y los otros 8 en el grupo de los tejidos sanos, aunque en subgrupos separados de los sanos (figura 50).



**Figura 50.-** Agrupamiento jerarquizado de los *microarrays* analizados, según los perfiles de expresión de los 24 genes seleccionados. ■ Tejidos sanos, ■ Tejidos peritumorales, ■ Tejidos tumorales.

El análisis por componentes principales mostró, como el algoritmo de agrupamiento jerarquizado, dos grupos de *microarrays* claramente separados, uno correspondiente a los de tejido tumoral y otro correspondiente a los de tejido sano. Los *microarrays* de tejido peritumoral se localizaron entre el grupo de los *microarrays* de tejido tumoral y los de tejido sano, excepto uno que se localizó en el grupo de los de tejido tumoral y 3 que se localizaron en el grupo de los de tejido sano (figura 51).

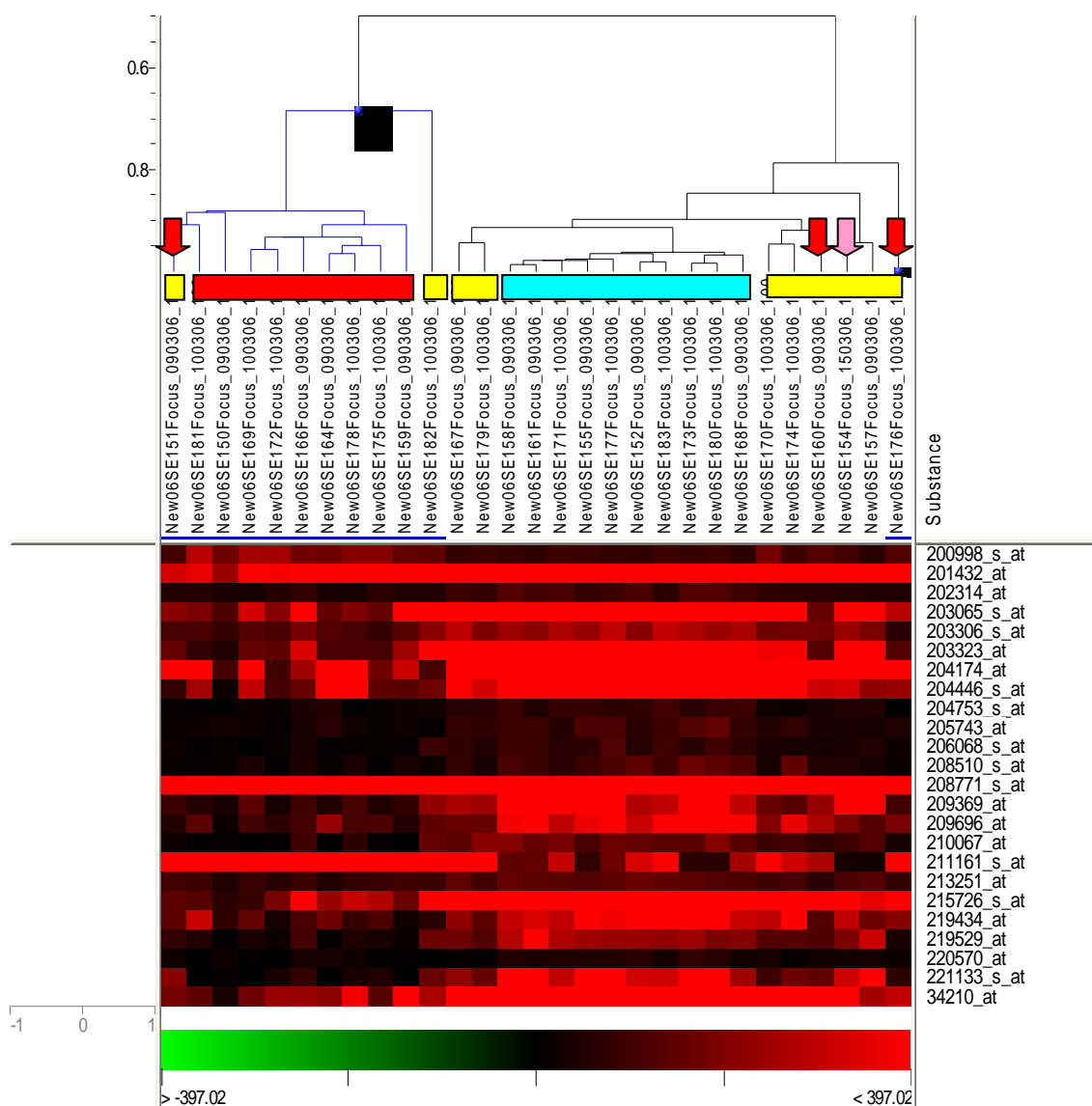


**Figura 51.-** Análisis por componentes principales de los *microarrays* analizados, según los perfiles de expresión de los 24 genes seleccionados.

■ Tejidos sanos, ■ Tejidos peritumorales, ■ Tejidos tumorales.

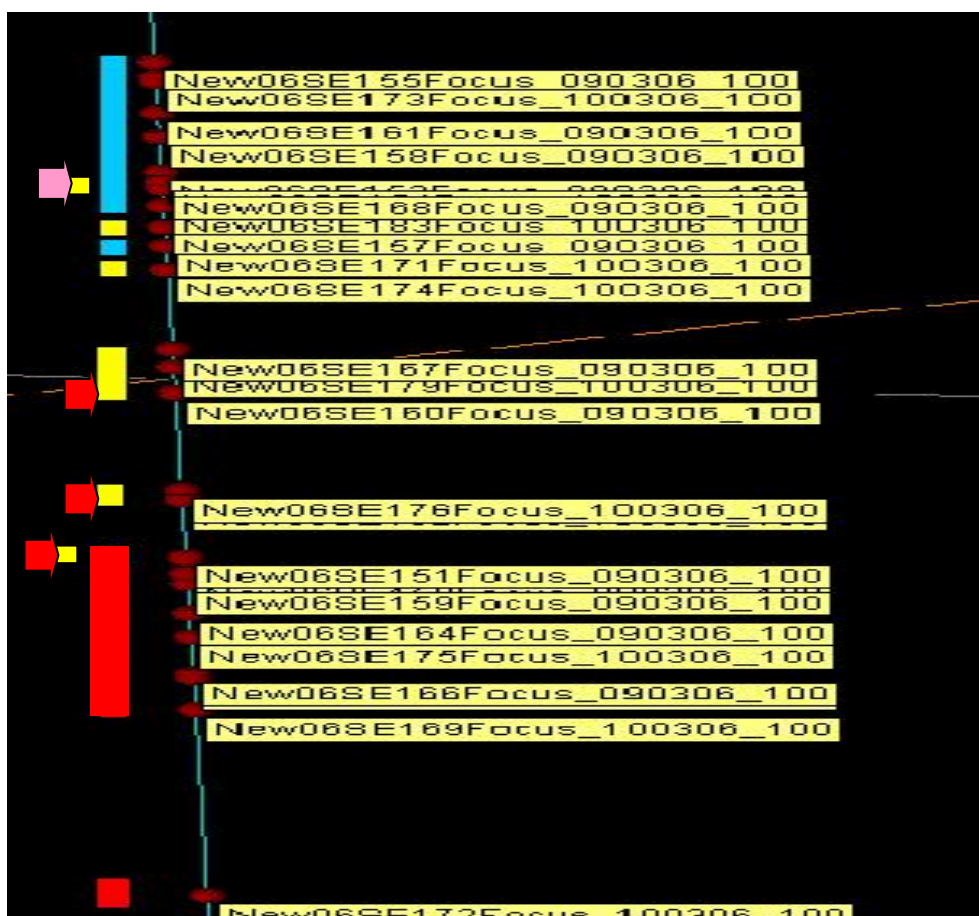
Un estudio posterior y más detallado de 9 de las 10 muestras de tejido peritumoral disponibles en bloque de parafina mostró que, 3 de esos tejidos tenían nichos tumorales en la mayor parte de los fragmentos estudiados, y que otro de los tejidos tenía nichos tumorales microscópicos (tabla 45 y figura 54).

La localización de los cuatro *microarrays* peritumorales con nichos tumorales en el agrupamiento jerarquizado y en el análisis por componentes principales se muestra en las figuras 52 y 53.



**Figura 52.-** Agrupamiento jerarquizado de los *microarrays* analizados, según los perfiles de expresión de los 24 genes seleccionados.

- Tejidos sanos, ■ Tejidos peritumorales, ■ Tejidos tumorales.
- ➔ Tejido peritumoral con nichos tumorales en la mayor parte del fragmento.
- ➔ Tejido peritumoral con nichos tumorales microscópicos.

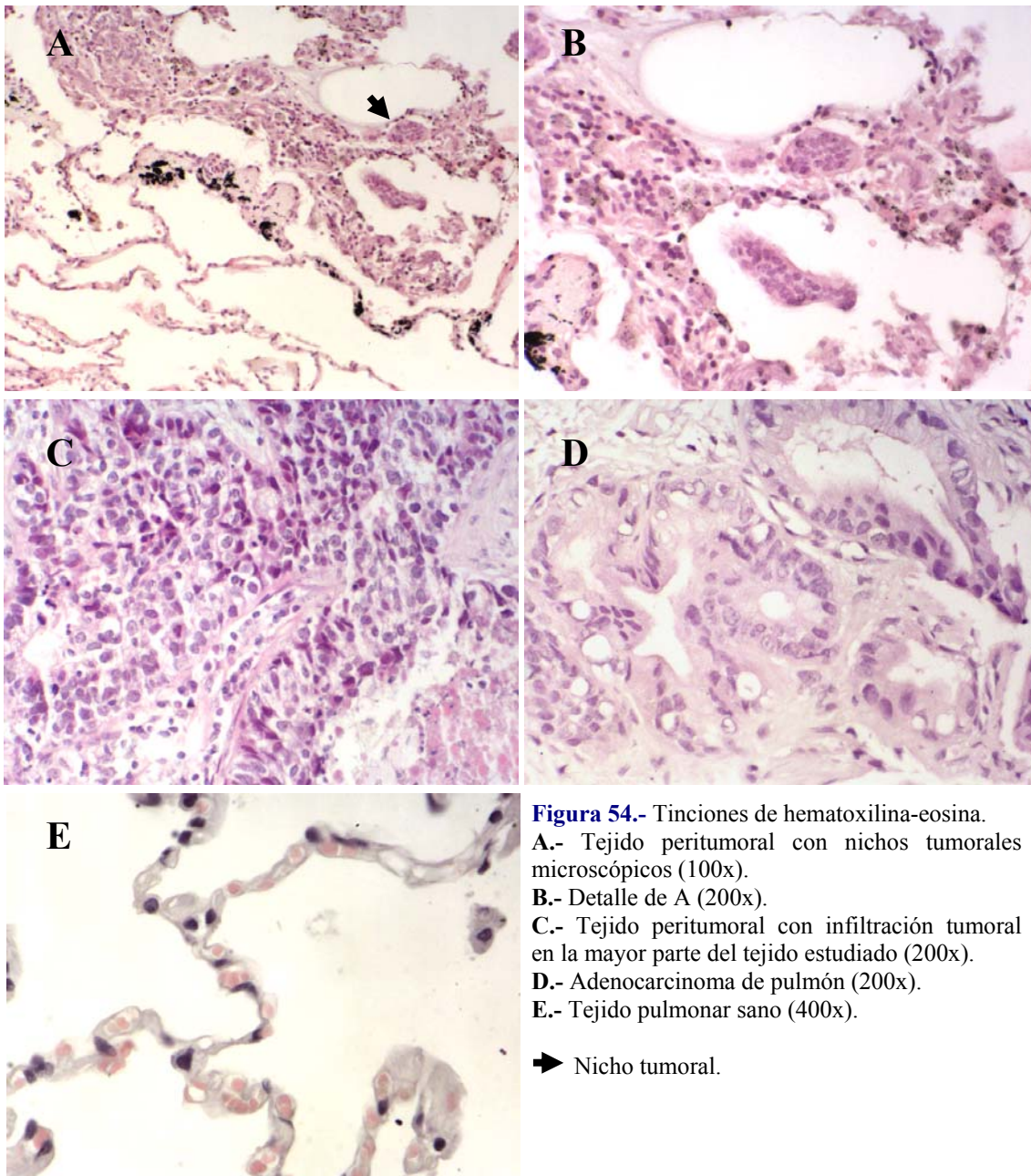


**Figura 53.-** Análisis por componentes principales de los *microarrays* analizados, según los perfiles de expresión de los 24 genes seleccionados.

- Tejidos sanos, ■ Tejidos peritumorales, ■ Tejidos tumorales
- ➔ Tejido peritumoral con nichos tumorales en la mayor parte del fragmento.
- ➔ Tejido peritumoral con nichos tumorales microscópicos.

| Código Muestra | Estudio histológico  |
|----------------|--|
| 06SE151        | Nichos tumorales en la mayor parte del fragmento                                     |
| 06SE154        | Parénquima alveolar y peribronquial con nichos tumorales microscópicos               |
| 06SE157        | Parénquima alveolar sin evidencia de tumor   |
| 06SE160        | Nichos tumorales en la mayor parte del fragmento con hiperplasia adenomatosa atípica |
| 06SE167        | Parénquima alveolar sin evidencia de tumor   |
| 06SE170        | Hiperplasia peribronquial sin evidencia de tumor                                     |
| 06SE174        | Parénquima periférico sin evidencia de tumor   |
| 06SE176        | Nichos tumorales en la mayor parte del fragmento                                     |
| 06SE179        | Muestra no disponible en parafina para su estudio                                    |
| 06SE182        | Parénquima alveolar sin evidencia de tumor   |

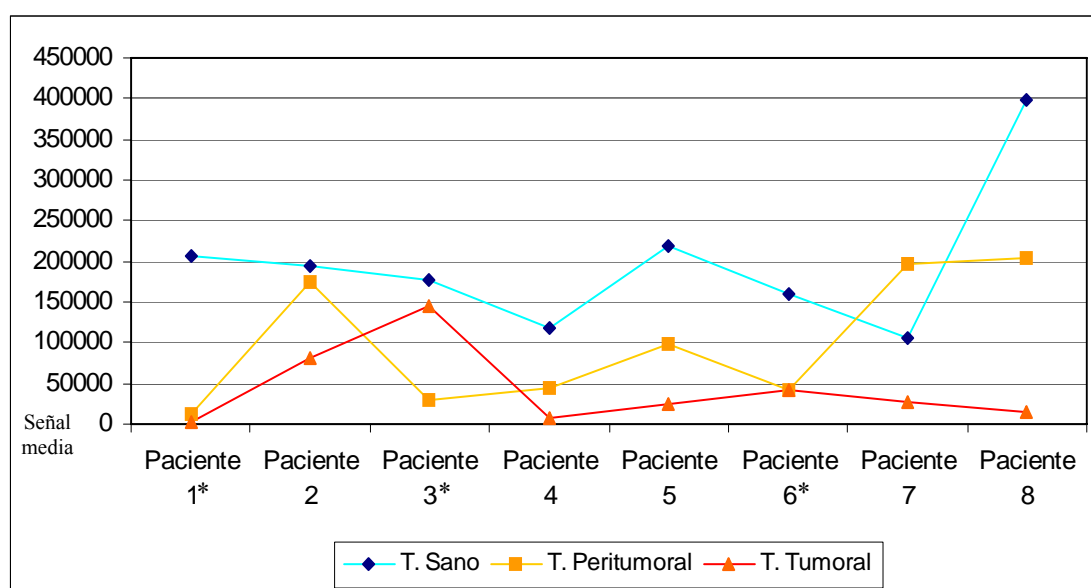
**Tabla 45.-** Estudio histológico de las muestras de tejido peritumoral disponibles en parafina.



### 4.3.5 Genes relacionados con los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis tumoral

El análisis de la expresión génica de los genes relacionados con los procesos biológicos de angiogénesis y linfangiogénesis, según el *gene ontology*<sup>331</sup>, mostró que sólo los niveles de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular D (VEGF-D) presentaba diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA con corrección de Bonferroni) entre los tres tipos de tejido estudiado.

Al observar la expresión de VEGF-D para los *microarrays* de cada tipo de tejido, se pudo comprobar que ésta era mayor en los *microarrays* de tejido sano respecto a los *microarrays* de tejido peritumoral y tumoral y, que la expresión media de los *microarrays* de tejido peritumoral era intermedia entre los de tejido sano y tejido tumoral (figuras 55 y 56). El SLR entre los tejidos sanos y los tumorales fue de 2,535, entre los tejidos sanos y peritumorales de 0,647 y entre los tejidos peritumorales y los tumorales de 1,888.

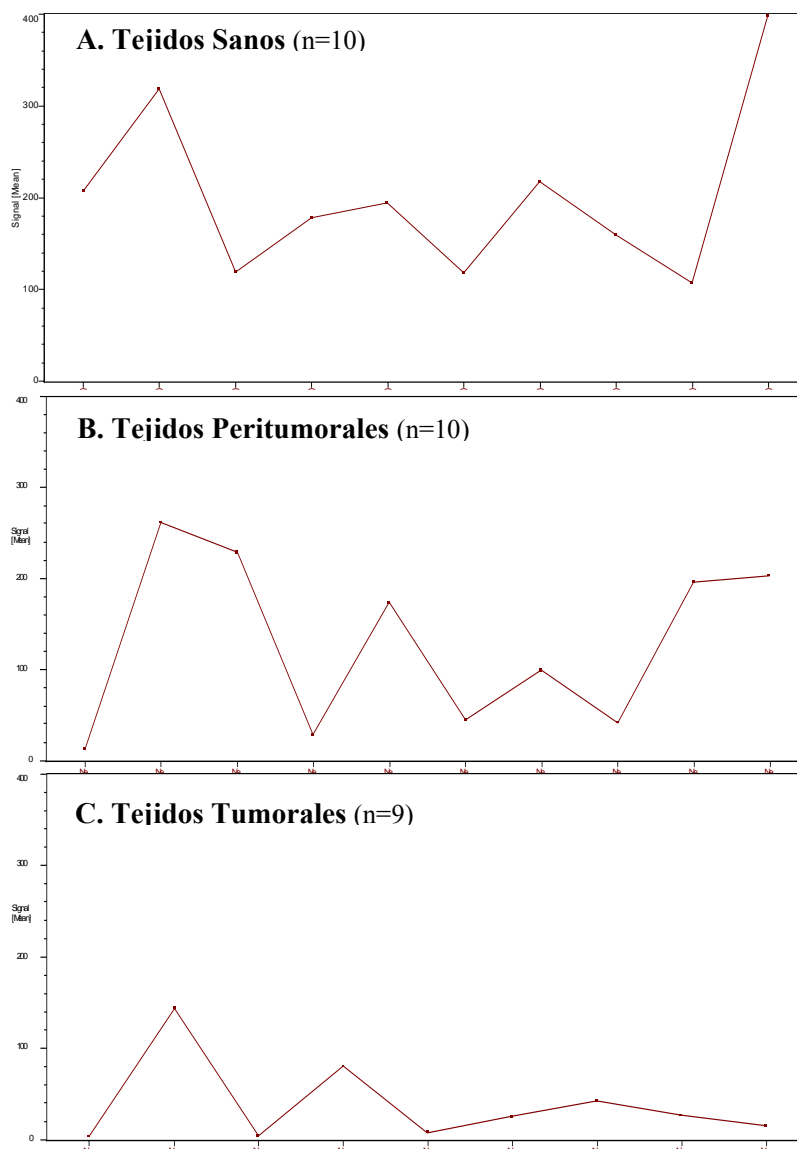


**Figura 55.-** Expresión VEGF-D en los 8 pacientes en los que se realizó los *microarrays* de los tres tipos de tejido.

\* Las muestras de tejido peritumoral de estos pacientes mostraron nichos tumorales mediante estudio por inmunohistoquímica (06SE151, 06SE160, 06SE176).

Códigos muestras: *Paciente 1.-* 06SE150, 06SE151, 06SE152; *Paciente 2.-* 06SE166, 06SE167, 06SE168; *Paciente 3.-* 06SE159, 06SE160, 06SE161; *Paciente 4.-* 06SE169, 06SE170, 06SE171; *Paciente 5.-* 06SE172, 06SE173, 06SE174; *Paciente 6.-* 06SE175, 06SE176, 06SE177; *Paciente 7.-* 06SE178, 06SE179, 06SE180; *Paciente 8.-* 06SE181, 06SE182, 06SE183.





**Figura 56.-** Expresión de VEGF-D según el tipo de tejido.

Al disponer de tejido en parafina de las muestras estudiadas mediante *microarrays*, se analizó la expresión de VEGF-D mediante técnicas inmunohistoquímicas. El tejido sano mostró expresión de VEGF-D en las células epiteliales de tipo neumocito II en todas menos una de las muestras estudiadas (8/9), y en las células endoteliales de los septos alveolares en el 100% (9/9) de las muestras. En los tejidos peritumorales, los 6 casos estudiados sin afectación tumoral expresaban VEGF-D en las células epiteliales y sólo 1 caso no mostraba expresión de VEGF-D en las células endoteliales. El 100% (9/9) de las muestras de tejido tumoral estudiadas y las cuatro muestras de tejido peritumoral que presentaban nichos tumorales expresaban VEGF-D en las células tumorales y endoteliales (tabla 46 y figura 57).

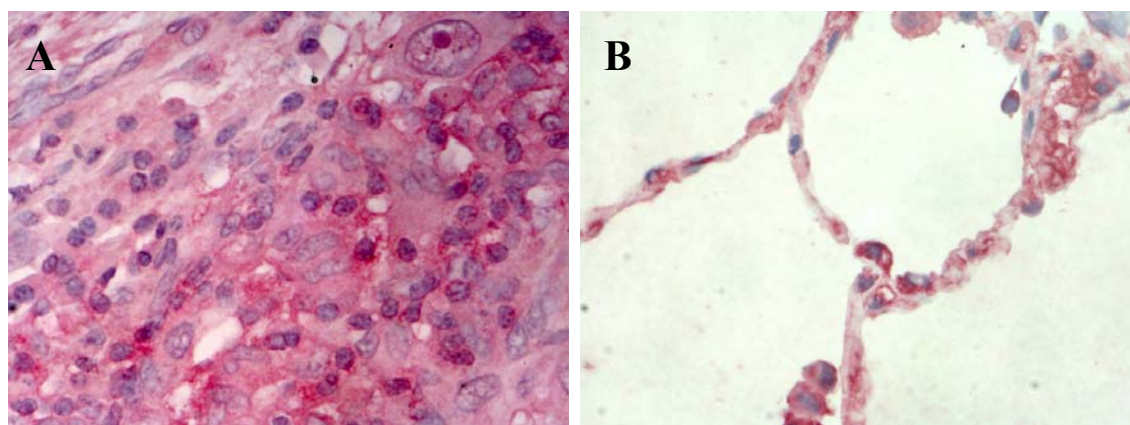
En las células endoteliales sólo se estudió ausencia o presencia de VEGF-D, en las células tumorales y epiteliales se estudiaron también los niveles de expresión, observando que el 88,8% (8/9) de los casos de tejido sano expresaban VEGF-D de manera baja, mientras que en el tejido tumoral VEGF-D se expresaba de manera baja sólo en el 33,3% (3/9) de los casos estudiados (tabla 46).

| Tipos de Tejido <sup>‡</sup> | Niveles de Expresión | Cl. Tumoral | Cl. Epitelial | Endotelio tumoral | Endotelio sano |
|------------------------------|----------------------|-------------|---------------|-------------------|----------------|
| T. Tumoral                   | Nula/Ausencia        | 0/9         | ---           | 0/9               | ---            |
|                              | Baja/Presencia       | 3/9         | ---           | 9/9               | ---            |
|                              | Moderada             | 4/9         | ---           | ---               | ---            |
|                              | Alta                 | 2/9         | ---           | ---               | ---            |
| T. Peritumoral               | Nula                 | 0/4         | 0/6           | 0/4               | 1/6            |
|                              | Baja                 | 3/4*        | 6/6*          | 4/4*              | 5/6*           |
|                              | Moderada             | 1/4         | 0/6           | ---               | ---            |
|                              | Alta                 | 0/4         | 0/6           | ---               | ---            |
| T. Sano                      | Nula/Ausencia        | ---         | 1/9           | ---               | 0/9            |
|                              | Baja/Presencia       | ---         | 8/9           | ---               | 9/9            |
|                              | Moderada             | ---         | 0/9           | ---               | ---            |
|                              | Alta                 | ---         | 0/9           | ---               | ---            |

**Tabla 46.-** Estudio inmunohistoquímico de la expresión de VEGF-D en las muestras estudiadas mediante *microarrays*.

<sup>‡</sup> No se pudieron estudiar las muestras 06SE179 y 06SE180 por falta de muestra en parafina.

\* Se estudiaron los nichos microscópicos tumorales y el tejido sano de la muestra 06SE154.



**Figura 57.-** Inmunohistoquímicas para VEGF-D (400x).

A.- Adenocarcinoma de pulmón.

B.- Tejido pulmonar sano.



## **5. DISCUSIÓN**

---



**L**os pacientes con cáncer de pulmón tienen un bajo grado de supervivencia, menor del 15% al cabo de cinco años de detectarse e iniciarse el tratamiento<sup>13</sup>. Esta baja supervivencia se debe a procesos metastásicos tempranos que ocurren en los estadios precoces del desarrollo tumoral, y no disponemos de medios eficaces para su detección y tratamiento<sup>22</sup>.

El fenómeno de neoangiogénesis es imprescindible para el crecimiento y la diseminación de las células tumorales que conducen a la malignización neoplásica. La neoangiogénesis determina un aumento de la densidad microvascular intratumoral y del fluido sanguíneo, y es esencial para el desarrollo tumoral a partir de 1mm<sup>3</sup> de tamaño del tumor<sup>48</sup>. En este contexto, se ha observado que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) desempeña un papel crítico en el fenómeno de neoangiogénesis<sup>334</sup>, que va acompañado de un aumento en los niveles de expresión del VEGF y proteínas relacionadas, junto con sus receptores<sup>57,59,64</sup>.

En nuestro estudio se han aplicado técnicas de biología celular, molecular y análisis de expresión génica diferencial en muestras clínicas de pacientes con cáncer de pulmón. El objetivo ha sido emplear estas tecnologías dentro del contexto clínico, con el fin de aportar nueva información biológica a cerca del proceso de neoangiogénesis, que permita predecir el potencial agresivo de los tumores pulmonares, para la adopción de estrategias más efectivas en el manejo de la enfermedad desde las etapas iniciales. Este estudio es el primero que analiza la expresión de todos los factores y receptores de la familia del VEGF, tanto en tejido pulmonar sano como en tejido tumoral obtenido de pacientes con cáncer de pulmón.

Los estudios realizados en el tejido pulmonar sano coinciden en la expresión de la proteína VEGF-A en el epitelio normal bronquial, así como en las células endoteliales<sup>61,63,186,187,193,196,211,335</sup>. En nuestro trabajo, sobre muestras de parénquima alveolar, los hallazgos en el epitelio alveolar muestran, principalmente, la expresión de VEGF-A y VEGF-D en células epiteliales de tipo neumocito II y en las células endoteliales del parénquima alveolar, algo observado por otros autores para VEGF-A<sup>184,188,192,335</sup>. Sólo los trabajos realizados por Giatromanolaki<sup>187</sup>, Koukourakis<sup>193</sup> y cols. no encuentran expresión de VEGF-A en el epitelio alveolar, lo que puede ser debido al

distinto anticuerpo utilizado, ya que los estudios que utilizan el mismo anticuerpo que el utilizado en este estudio muestran la expresión de VEGF-A en las células del epitelio alveolar<sup>184,192,335</sup>. La expresión que encontramos para VEGF-B y VEGF-D, no ha sido descrita anteriormente en el parénquima alveolar del tejido pulmonar, aunque Niki y cols.<sup>336</sup> encuentran la expresión del mRNA para estos factores en el tejido pulmonar sano, lo que explica que encontremos en nuestras de tejido normal la expresión de la proteína. Sin embargo, para VEGF-C no encontramos expresión en el tejido pulmonar sano, lo que coincide con lo descrito por otros autores<sup>216,217,219,337,338</sup>.

La expresión proteica de los distintos receptores también la encontramos en el epitelio alveolar de algunas de las muestras de tejido sano pulmonar, concretamente en células epiteliales de tipo neumocito II y, para VEGFR1, en células endoteliales del parénquima alveolar, como también ha sido observado anteriormente por otros autores<sup>192,335,338</sup>.

La expresión de estos factores y receptores en el tejido pulmonar sano observada en este y otros trabajos anteriormente mencionados, parece explicarse por el daño que sufren las células de este tejido al estar expuestas a distintos agentes ambientales, como los productos tóxicos que contiene el humo del tabaco, que podrían inducir una respuesta proliferativa para la reposición de las células dañadas, en la que estos factores se verían implicados. En este sentido, Hiroshima y cols.<sup>61</sup> ya mostraban un aumento de la proliferación celular, junto con un aumento en el número de vasos en el epitelio normal de personas fumadoras respecto a otras no fumadoras. Además, otros trabajos han demostrado, en muestras de biopsias bronquiales y en modelos animales, que la exposición al humo del tabaco incrementa la proliferación de las células epiteliales y del endotelio del parénquima alveolar, lo que podría ser decisivo en el proceso de carcinogénesis<sup>339-341</sup>.

Merrick y cols.<sup>63</sup> demostraron en pacientes fumadores de más de 30 paquetes al año, no sólo la elevación de los niveles del mRNA para VEGF-A, VEGFR1 y VEGFR2, así como un aumento en el número de vasos en muestras de displasia respecto a muestras de tejido normal, sino además, que los niveles de expresión de VEGF-A fueron mayores en aquellas muestras de tejido normal de pacientes con displasia en las

vías respiratorias respecto a las muestras de pacientes que no mostraron evidencias de presentar displasia. También, aquellos pacientes que fumaban más de cincuenta paquetes al año mostraban mayores niveles de RNA mensajero para VEGF-A que aquellos que fumaban menos de esa cantidad. Por otro lado, Sartelet y cols.<sup>335</sup> encontraron un aumento en la expresión proteica de VEGF-A, VEGFR1 y VEGFR2 en el tejido normal próximo a lesiones precursoras de tumores pulmonares neuroendocrinos. Estos estudios, y la expresión encontrada para los factores y receptores de la familia del VEGF en nuestro trabajo, donde todos los pacientes analizados presentan antecedentes de tabaquismo activo, nos sugieren que el fenómeno de neoangiogénesis empieza a ocurrir ya en el tejido pulmonar histológicamente sano como respuesta a la exposición de carcinógenos.

Una vez producida la lesión tumoral, la expresión de las proteínas de la familia VEGF y sus receptores se ha observado elevada respecto a las lesiones preneoplásicas y al tejido pulmonar sano<sup>61,63,196,216,217,219,337,338</sup>. El aumento de la expresión de estas proteínas se ha relacionado con el aumento del número de vasos en los tumores<sup>181,186,189,194,199-201,203,216,220,342,343</sup>.

Analizando globalmente la expresión de los factores y receptores del VEGF en el tejido tumoral, encontramos que un alto porcentaje de las muestras presentan marcaje para alguno de los factores y receptores tanto en las células tumorales como en las células endoteliales de los vasos. Si bien, no hemos encontrado ningún trabajo que analice la expresión de todos los factores y receptores de la familia del VEGF en un solo estudio, los estudios realizados en cada uno de ellos en muestras de pacientes con cáncer de pulmón, excepto para VEGF-B y VEGF-D para los que no hemos encontrado trabajos, reproducen, en general, lo observado por nosotros.

Hemos observado que, un alto número de pacientes expresan VEGF-A en las células tumorales de los tejidos analizados, al igual que lo descrito por un gran número de autores<sup>61,181,182,184,187-190,192,195,196,198-201,205,206,209,211,239,343-346</sup>. Sólo hemos encontrado 7 trabajos donde la mayor parte de las muestras de los pacientes analizados no expresan VEGF-A<sup>193,194,207,208,213,219,347</sup>. Por otro lado, aunque no observamos la expresión de VEGF-B en un alto número de pacientes, sí que ha sido observada en alguno de ellos.



Esta expresión de VEGF-B que sí se ha observado en otros tipos de tumores<sup>129</sup>, no ha sido anteriormente descrita en cáncer de pulmón.

La expresión de VEGF-C en las células tumorales se ha encontrado en la mayoría de pacientes analizados al igual que en otros trabajos<sup>217,218,337</sup>. Sin embargo, no todos los estudios realizados en VEGF-C reproducen estos resultados, ya que en algunos aunque se encuentra su expresión en varios de los tumores, éstos no superan el 50% de las muestras estudiadas<sup>195,216,219,338,345</sup>. La expresión de VEGF-D la encontramos en un gran número de pacientes, que al igual que para VEGF-B, tampoco encontramos trabajos que describan su expresión en muestras de pacientes con cáncer de pulmón. Sin embargo, estudios realizados en otros tipos tumorales muestran, al igual que nosotros, que un alto número de los pacientes examinados expresan VEGF-D en el tejido tumoral<sup>167,171,348</sup>.

La expresión de VEGFR1 y VEGFR2 la encontramos también en un alto número de pacientes, al igual que la mayoría de los autores que analizan su expresión en las células tumorales<sup>182,192</sup>. Sólo Seto y cols.<sup>207</sup> muestran expresión de VEGFR1 y VEGFR2 en menos del 50% de los pacientes estudiados. La expresión de VEGFR3 la observamos en más del 50% de los pacientes estudiados, al igual que Kajita y cols.<sup>216</sup>, ya que el resto de autores muestran que menos del 50% de los pacientes con cáncer de pulmón expresan VEGFR3<sup>217,220,338</sup>.

Las diferencias encontradas entre nuestro estudio y los trabajos mencionados anteriormente sobre un mismo factor o receptor, parecen ser debidas al uso de distintos anticuerpos, y/o a las distintas maneras de valorar los resultados.

La expresión que encontramos para los distintos VEGFRs en las células endoteliales y su implicación en el proceso de neoangiogénesis es bien conocida<sup>57,349,350</sup>. Sin embargo, su función en las células tumorales no lo es tanto. Decaussin y cols.<sup>192</sup> fueron los primeros en describir la expresión de VEGFR1 y VEGFR2 en células tumorales broncogénicas, además de correlacionar la expresión de VEGF-A con la expresión de VEGFR1 en las células tumorales. Posteriormente, los grupos de Kajita<sup>216</sup>, Kojima<sup>219</sup> y cols. correlacionaron la expresión de VEGF-C con la correspondiente de

VEGFR2 y VEGFR3, y recientemente Seto y cols.<sup>207</sup> también correlacionaron la expresión de VEGF-A con la de VEGFR2 en las células tumorales de pacientes con cáncer de pulmón. Estudios *in vitro* parecen indicar que la expresión de estos receptores en las células tumorales inducen la proliferación celular<sup>350,351</sup>. Estos resultados nos hacen pensar que además de la regulación paracrina ya conocida, existe otra de tipo autocrina del crecimiento tumoral<sup>352-357</sup>. De hecho, el alto número de pacientes con cáncer de pulmón que expresan alguno de los factores y receptores de la familia del VEGF, en este y otros trabajos mencionados anteriormente, parece estar relacionado con el alto potencial de malignidad que tienen este tipo de tumores<sup>207</sup>, aunque en la actualidad se desconoce el papel concreto que juegan los VEGFs y VEGFRs en las células tumorales.

Respecto a la expresión de los distintos VEGFs y VEGFRs en las células endoteliales de los tumores, ésta la observamos inferior a la esperada para cada uno de ellos, a pesar de que muchos pacientes expresan alguno, lo que puede explicarse porque al ser el tejido pulmonar rico en capilares y pequeños vasos donde se va a realizar el intercambio gaseoso, los tumores pulmonares pueden aprovechar esta rica vasculatura para su crecimiento y diseminación, como ya han descrito algunos autores<sup>200,358,359</sup>.

Sólo VEGF-A y VEGFR2 los encontramos expresados en la mitad de los casos analizados. El análisis de la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en las células endoteliales se realiza en muy pocos estudios relacionados con el cáncer de pulmón. Decaussin<sup>192</sup>, Kajita<sup>216</sup>, Kojima<sup>219</sup>, Niki<sup>342</sup> y cols. muestran una sobreestimación de la expresión de VEGF-A y los distintos receptores respecto a nuestro trabajo. Estas diferencias pueden ser debidas, además de lo comentado anteriormente sobre el uso de distintos anticuerpos, a la dificultad de valorar la expresión de estos marcadores en este tipo de células, ya que los métodos agresivos utilizados durante la realización de las técnicas inmunohistoquímicas, principalmente en las biopsias obtenidas mediante broncoscopia, van a afectar a la estructura de los capilares.

Con relación a la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF respecto a los factores clínicos, encontramos que en los pacientes mayores de 67 años la

frecuencia y el nivel de expresión para VEGF-C es mayor que para los menores de 67 años y, además, una expresión más intensa de VEGFR1. Este hecho, contrasta con los trabajos realizados por el grupo de Arinaga y cols.<sup>217</sup>, donde los pacientes mayores de 65 años expresan con menor frecuencia VEGFR3 en las células tumorales que los menores de 65 años. Sin embargo, esta expresión que encontramos para VEGF-C en los pacientes mayores de 67 años podría explicar la ligera disminución de la probabilidad de supervivencia que se produce en estos pacientes respecto a aquellos menores de 67 años, ya que aunque nosotros sólo hemos podido observar una ligera disminución de la supervivencia a los 2 años de evolución en los pacientes que expresan VEGF-C, otros estudios si relacionan la expresión de VEGF-C con una disminución significativa de la supervivencia con evoluciones a 5 y 10 años, respecto a aquellos que no lo expresan<sup>216-219,345</sup>.

Respecto al tamaño tumoral, observamos en la expresión proteica de las células endoteliales para VEGF-D y VEGFR3, que los pacientes con tumores mayores de 6 centímetros expresan estos factores en menor frecuencia que aquellos pacientes con tumores menores de 6 centímetros. Niki y cols.<sup>336</sup> ya mostraron una disminución del mRNA para VEGF-D según aumentaba el tamaño de los tumores. Los estudios realizados en modelos *in vivo* por Yoshiji y cols.<sup>334</sup> para VEGF-A, mostraron que la expresión del factor VEGF-A era indispensable en los estadios iniciales del crecimiento tumoral, mientras que, en tumores desarrollados y con un crecimiento estable, la inhibición de la expresión de VEGF-A y, por lo tanto, su función parecía ser reemplazada por otros factores como FGFb y TGF $\alpha$ . Recientemente, Moffat y cols.<sup>360</sup> han descrito que la inhibición de VEGF-A *in vitro* causa un incremento de la expresión de VEGF-D. Además, Ohta y cols.<sup>184</sup> también observaron que pacientes con tumores de pulmón menores de 3 centímetros expresaban mayor cantidad de mRNA para VEGF-A que aquellos con tumores de tamaños superiores. Nuestros resultados y estos estudios sugieren que la mayor frecuencia de expresión de VEGF-D y VEGFR3 en el endotelio de los tumores menores de 6 centímetros estudiados pueda deberse a la necesidad de promover la formación del estroma en los momentos iniciales del crecimiento tumoral, con el posterior desarrollo de un estroma maduro e independiente de estos factores, que pueda soportar el crecimiento y la diseminación del tumor, tal y como proponen Yoshiji y cols<sup>334</sup>.

Las diferencias encontradas para la expresión de los distintos factores y receptores del VEGF entre las distintas localizaciones de los tumores aún no tienen una clara explicación, debido, principalmente a la falta de estudios en este sentido. Las explicaciones a estas diferencias quizás puedan deberse a razones anatómo-fisiológicas o al azar, por el diferente número de casos comparados al segregar los tumores por su localización. Serían necesarios nuevos estudios para poder aclarar el papel de la diferente expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en la localización de los tumores.

Referente a la estirpe histológica, hemos constatado que los tumores de células pequeñas expresan en las células tumorales, el factor VEGF-A en menor frecuencia y niveles que los no microcíticos. Esta menor expresión de VEGF-A en los tumores de células pequeñas ya fue observada mediante el estudio del mRNA por Merrick y cols<sup>63</sup>. Además, expresan con una mayor frecuencia VEGF-C y VEGF-D respecto a VEGF-A, en comparación con los tumores no microcíticos. La expresión de VEGF-C y VEGF-D, factores predominantemente linfangiogénicos<sup>66,67,69</sup> en células con características neuroendocrinas, como las de los tumores de células pequeñas<sup>19</sup>, ya fue observada anteriormente por Partanen y cols<sup>361</sup>. Esto parece ser acorde con la precoz invasión y diseminación a través del sistema linfático regional en esta estirpe, siendo, desde el punto de vista clínico, la estirpe más agresiva y con la menor tasa de supervivencia<sup>19,20,362</sup>.

Respecto a las distintas estirpes que conforman el grupo de los tumores no microcíticos, hemos observado que los tumores de células grandes se caracterizan por la expresión de VEGFR2 y, por la ausencia de VEGF-D, en las células tumorales de todos los casos estudiados; además, expresan mayores niveles de VEGFR2, y en menor medida de VEGFR3, respecto al resto de las estirpes. Los tumores de tipo adenocarcinoma se caracterizan por expresar con mayor frecuencia VEGF-A y VEGFR3 en sus células endoteliales, respecto a los tumores de tipo epidermoide. Las diferencias encontradas en la expresión de los distintos factores y receptores de la familia del VEGF, para las distintas estirpes de tumores no microcíticos, podrían estar implicadas en el distinto comportamiento de estas. Los tumores de tipo epidermoide tienden a presentar una localización central, mientras que los de tipo adenocarcinoma y

células grandes tienden a localizarse periféricamente<sup>19,363</sup>. Paralelamente, los tumores de tipo epidermoide tienden al crecimiento local y son menos propensos a la diseminación linfática y sistémica respecto a los no epidermoides<sup>363-366</sup>.

Los diversos estudios realizados hasta la fecha, salvo contadas excepciones<sup>196,203,219,342</sup>, no han logrado encontrar una relación clara entre la expresión de los distintos factores y receptores de la familia del VEGF y los distintos estadios del cáncer de pulmón<sup>182,187-189,192,197,198,201,204,206,208,211,213,214,216-218,220,337,338,345,367-369</sup>. Inoshima y cols.<sup>203</sup> muestran que los pacientes con tumores en estadios avanzados (III-IV) expresan con mayor frecuencia niveles más elevados de VEGF-A, respecto a aquellos en estadios más iniciales (I-II); además, Yuan y cols.<sup>196</sup> demuestran que estas diferencias se hacen más patentes al considerar los niveles de mRNA respecto a los niveles de la proteína. Por otro lado, Kojima y cols.<sup>219</sup> observaron un aumento de la frecuencia de pacientes que expresan VEGFR3, tanto en las células tumorales como endoteliales en los estadios IIA y IIIA; mientras que, Niki y cols.<sup>342</sup> observaron un aumento de la densidad de vasos VEGFR3 positivos en los pacientes en estadios superiores al IA.

Todos los trabajos citados anteriormente, excepto el de Ludovini y cols.<sup>213</sup> realizado en pacientes no quirúrgicos, se realizaron en pacientes sometidos a resección quirúrgica y, por lo tanto, la estadificación estudiada es la patológica o post-quirúrgica. Nuestro estudio sobre aquellos pacientes sometidos a cirugía, reveló que los pacientes con estadios II y III expresaban con mayor frecuencia VEGF-D y VEGFR2 en las células tumorales, respecto a aquellos clasificados como estadio I, que a su vez, expresaban con mayor frecuencia VEGFR1 respecto a los pacientes con estadio III. Además, estas diferencias también se observaron en los niveles de expresión de estas proteínas junto con un aumento de los niveles de VEGF-A en los pacientes con estadio III, respecto a aquellos clasificados como estadio I.

Los pacientes clasificados como estadios II y III se caracterizan principalmente por la afectación tumoral de ganglios linfáticos y la invasión a otras estructuras<sup>20</sup>. El mayor número de pacientes que expresan VEGF-D y el aumento de los niveles que hemos encontrado en estos estadios respecto al estadio I, podrían justificar la

diseminación a ganglios linfáticos de las células tumorales de los estadios II y III, ya que en modelos animales se ha observado que la expresión de VEGF-D, proteolíticamente activada por parte de las células del tumor, es capaz de activar el desarrollo de nuevos vasos linfáticos y facilitar la metástasis a ganglios linfáticos<sup>69,370</sup>. Sin embargo, Niki y cols.<sup>336</sup> en pacientes con adenocarcinoma de pulmón muestran una correlación inversa entre la expresión del mRNA de VEGF-D y la metástasis a ganglios linfáticos; esto puede ser engañoso, ya que VEGF-D es una proteína que para activarse debe ser procesada proteolíticamente en los extremos N-terminal y C-terminal para poder unirse con alta afinidad a VEGFR2 y VEGFR3<sup>118</sup>. Por lo tanto, la expresión del gen que codifica para VEGF-D en ausencia del procesamiento post-transduccional sólo permitiría la acumulación de proteína VEGF-D biológicamente inactiva en el tumor. Otros estudios realizados en pacientes con distintos tipos de tumores, mediante el análisis de la expresión de la proteína, encuentran una clara relación entre la expresión de VEGF-D en el tumor y la diseminación a ganglios linfáticos<sup>167,168,171,172,180,348,371,372</sup>. Además, la expresión de VEGF-D no sólo se ha visto relacionada con la invasión y diseminación en ganglios linfáticos por parte de las células tumorales, sino también, se ha visto relacionada con la invasión de otras estructuras, como la pleura, en modelos animales<sup>370</sup>.

Nuestro trabajo y estudios previos han mostrado la expresión de VEGFR1 y VEGFR2 en células tumorales<sup>182,192,207,369</sup>. Sin embargo, su relación con el estadio y el avance de la enfermedad se desconoce. Estudios *in vitro* han mostrado que la adición de VEGF-A incrementa el crecimiento de las células que expresan VEGFR2<sup>350,351</sup>, lo que sugiere una regulación tanto autocrina como paracrina del crecimiento tumoral<sup>353-355</sup>. Contrariamente, la débil capacidad de VEGFR1 para transmitir señales al interior de la célula y la mayor afinidad por VEGF-A<sup>373-376</sup>, respecto a VEGFR2, sugiere que VEGFR1 podría neutralizar los efectos que VEGF-A genera en el tumor a través de VEGFR2.

Los estudios realizados durante el desarrollo embrionario en modelos animales han demostrado que VEGFR2 es imprescindible en la diferenciación de las células endoteliales y hematopoyéticas, a partir de células mesodérmicas precursoras<sup>377-380</sup>. También se ha observado que VEGFR1 es necesario durante el desarrollo embrionario,

ya que su ausencia provoca un exceso de células endoteliales y hematopoyéticas, junto con la muerte del embrión por un desarrollo anormal de la vasculatura<sup>381,382</sup>. Sin embargo, la expresión de VEGFR1, aunque sin la actividad tirosina-kinasa, es suficiente para el desarrollo normal de la vasculatura<sup>383</sup>. Esto parece indicar que la principal función de VEGFR1 es la de modular la actividad de VEGFR2 de manera negativa, mediante su unión a VEGF-A<sup>351</sup>. Los estudios *in vitro* realizados en este sentido por Hirashima y cols.<sup>384</sup> demostraron que la inducción del crecimiento y la diferenciación de las células mesodérmicas en células endoteliales eran independientes de la dosis de VEGF-A administrada, a través de VEGFR2. Sin embargo, durante fases más tardías se observó que el mantenimiento de la diferenciación de las células endoteliales pasaba a ser dependiente de la dosis de VEGF-A administrada, lo que se vio relacionado con un aumento de la expresión de VEGFR1. Estos hallazgos, junto con los trabajos de Camelié y cols.<sup>89</sup> en embriones VEGF-A<sup>+/-</sup> donde la proliferación y densidad de células endoteliales fueron normales durante la vasculogénesis pero la remodelación vascular posterior fue defectuosa, hacen pensar que la función de VEGFR1 podría ser antagonista a la de VEGFR2 a través de su unión a VEGF-A.

Takenaka y cols.<sup>369</sup> en pacientes con cáncer de pulmón han mostrado que una alta proporción de mRNA para VEGFR1 respecto a VEGF-A, está inversamente relacionada con la angiogénesis tumoral y un mejor pronóstico de la enfermedad. Por el contrario, Koukourakis y cols.<sup>193</sup> muestran que un alto número de complejos VEGF-A/VEGFR2 producen una respuesta angiogénica muy intensa por parte de los tumores y se relacionan con un peor pronóstico de la enfermedad.

Este efecto antagonista de VEGFR1 respecto a VEGFR2 que se observa durante el desarrollo embrionario y, que parece darse también en pacientes con cáncer de pulmón, podría explicar los resultados obtenidos en la clasificación post-quirúrgica de los pacientes intervenidos mediante cirugía. En estos pacientes, VEGFR1 se expresa preferentemente y en mayores niveles en tumores localizados (estadio I) y con un mejor pronóstico, respecto a VEGFR2, que se expresa preferentemente y en niveles mayores en el estadio III, caracterizado por la diseminación y/o invasión de otras estructuras con un peor pronóstico<sup>20</sup>. Por ello, cabe pensar que, la sustitución que observamos de VEGFR1 por VEGFR2 y el aumento de los niveles de VEGF-A en el estadio III,

respecto al estadio I, podrían estar implicados en el proceso de malignización tumoral. Sin embargo, investigaciones futuras deberán clarificar la función de VEGFR1 en las células tumorales y los efectos de las interacciones entre VEGFR1 y VEGFR2 durante el desarrollo tumoral.

Al estudiar las diferencias observadas anteriormente en la expresión de VEGF-D, VEGFR1 y VEGFR2, según la estadificación de los pacientes incluidos en el estudio, podemos observar que, aunque estas diferencias se siguen dando, se dan en menor proporción que en la estadificación post-quirúrgica de los pacientes intervenidos mediante cirugía. Esto parece indicar que las diferencias serían más manifiestas si se hubiese progresado en la estadificación de los 36 pacientes sin estadificación post-quirúrgica.

La estadificación clínica se fundamenta en la información diagnóstica y evaluativa obtenida antes de iniciar el tratamiento, mediante técnicas radiológicas, principalmente la tomografía axial computerizada de alta resolución (TACAR) y técnicas invasivas como la broncoscopia<sup>20</sup>. Inicialmente, la determinación de la afectación de los ganglios linfáticos regionales se realiza mediante TACAR, siguiendo criterios de tamaño, lo que presenta una baja sensibilidad y especificidad, ya que puede darse la situación de que adenopatías significativas (>1cm) valoradas como metastásicas puedan deberse a fenómenos reactivos antigénicos o inflamatorios/infecciosos y, viceversa, adenopatías de tamaño no significativo (<1cm) puedan presentar citología maligna<sup>385</sup>. Ante la duda de afectación mediastínica mediante TACAR y en pacientes en los que se plantea actitud terapéutica quirúrgica, se progresa en la estadificación mediante la realización de la mediastinoscopia, confirmándose la existencia o ausencia de afectación tumoral. Además, pacientes con mediastinoscopia negativa para malignidad y posterior abordaje quirúrgico, pueden presentar afectación tumoral mediastínica demostrada en el posterior análisis anatómo-patológico de las adenopatías resecadas.

En aquellos pacientes en los que no se contempla cirugía por presentar comorbilidad asociada, metástasis a distancia, etc. no se suelen realizar pruebas más exhaustivas para conocer la afectación ganglionar. En nuestro estudio sólo en 22 de los



58 pacientes estudiados se progresa hasta la estadificación post-quirúrgica, 6 pacientes fueron infravalorados y 4 sobrevalorados en la estadificación clínica. Por otro lado, la búsqueda exhaustiva de metástasis a distancia en pacientes asintomáticos y sin anormalidades analíticas no está indicada, dada la baja probabilidad de detección de metástasis silentes. Sólo en los casos en los que existen síntomas o signos sugestivos, se indican las exploraciones pertinentes para descartar la presencia de metástasis<sup>27</sup>.

Parece claro, pues, que la ausencia de la confirmación citohistológica de metástasis en ganglios linfáticos, tanto sospechosos como no sospechosos de malignidad en el TACAR, en la mayoría de los pacientes estudiados, junto con la no indicación en la búsqueda de metástasis cuando el paciente se muestra asintomático, puede ocasionar que la estadificación asignada en la clasificación TNM no sea la que corresponda. Esto puede influir en que tras el análisis de la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF según la TNM post-quirúrgica, las diferencias entre los distintos estadios sean más acentuadas, que las encontradas al comparar con la TNM de los 58 pacientes estudiados, en los que en 36 casos no se avanzó más allá de la estadificación clínica.

En este sentido, al comparar la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF entre la TNM clínica y la TNM post-quirúrgica, observamos que VEGF-D se expresa con mayor frecuencia y niveles en el estadio I respecto al estadio III en la TNM clínica, pero que en la clasificación TNM post-quirúrgica VEGF-D se expresa con mayor frecuencia y niveles en el estadio III respecto al estadio I. Al mismo tiempo, los niveles de VEGF-C aumentan en el estadio III de la estadificación post-quirúrgica respecto al estadio III de la TNM clínica.

Esto se corresponde con que la clasificación TNM post-quirúrgica, respecto a la TNM clínica, parece reflejar mejor el verdadero estado del crecimiento y la diseminación del tumor, ya que el aumento en el número de pacientes que expresan VEGF-D y en los niveles de VEGF-C y VEGF-D en el estadio III de la clasificación TNM post-quirúrgica, parece relacionarse con un aumento en la capacidad de diseminación ganglionar de los tumores en los que estos factores están implicados<sup>66,67,69,370</sup>.

Respecto a la expresión de los receptores, VEGFR1 se expresaba con menor frecuencia y niveles en pacientes con estadio III en la clasificación TNM post-quirúrgica frente a la TNM clínica, mientras que VEGFR2 también se expresaba con menor frecuencia y niveles en pacientes con estadio I en la estadificación TNM post-quirúrgica frente a la TNM clínica. Esto hace pensar que, mientras en la clasificación TNM clínica las diferencias en la expresión de VEGFR1 y VEGFR2 entre los estadios I y III sean muy pequeñas, en la TNM post-quirúrgica éstas se acrecientan. Estas diferencias en la expresión de VEGFR1 y VEGFR2 entre los estadios I y III de la clasificación TNM post-quirúrgica podrían estar relacionadas con el proceso de malignización de los tumores, como ya se ha comentado anteriormente.

Sin embargo, a pesar de que la TNM post-quirúrgica es más precisa que la estadificación clínica y se ajusta más a la realidad de la extensión tumoral<sup>27</sup>, no se evalúa la totalidad de los ganglios linfáticos en los pacientes quirúrgicos, ya que se realiza una selección mediante un muestreo ganglionar donde el cirujano explora unas estaciones ganglionares pulmonares y mediastínicas, guiado por el conocimiento de la probabilidad del patrón de metástasis ganglionar según el tamaño, la estirpe y la localización del tumor, e incluso aunque se realice la disección ganglionar sistemática, no todos los ganglios son accesibles a la disección<sup>386</sup>. Además, distintos estudios han mostrado una desestimación en la tasa de recurrencia real en pacientes con ganglios positivos al emplear técnicas de histopatología e inmunohistoquímica de carácter rutinario en el ámbito hospitalario<sup>387-392</sup>, lo que ha llevado a proponer a algunos autores el aumento del número de cortes histológicos a analizar de las piezas de tejido ganglionares, o, al menos, a analizar cortes seriados en diferentes regiones del ganglio extirpado<sup>388,393</sup>.

Parece claro, por lo tanto, que a pesar de que la clasificación TNM post-quirúrgica sea más fiable que la TNM clínica, podríamos seguir teniendo pacientes intervenidos mediante cirugía cuya clasificación no sea la correcta. Así pues, se hacen necesarios estudios más exhaustivos sobre la relación entre la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF y la estadificación del cáncer de pulmón, de tal manera, que la inclusión del estudio de la expresión de estos factores en la clasificación

TNM podría ayudar a una evaluación y clasificación más certera de los tumores pulmonares.

Un alto número de trabajos han intentado relacionar la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF con el pronóstico de la enfermedad. En nuestro estudio, a los 2 años de evolución, se observa como la expresión y los niveles de VEGFR2 en las células tumorales son un factor de mal pronóstico en los pacientes estudiados. Aquellos que expresan VEGFR2 tienen un tiempo de supervivencia 7 meses menor, aproximadamente, que aquellos que no lo expresan y, los que lo expresan con niveles altos tienen alrededor de unos 10 meses menos de supervivencia que aquellos que no expresan VEGFR2. Por otro lado, la expresión de VEGFR3 en el núcleo de las células endoteliales, no descrita anteriormente a este trabajo, parece ser un factor de buen pronóstico respecto a aquellos que no lo expresan en esta localización. Finalmente, para la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en las células endoteliales sólo se ha observado que VEGF-D es un factor de buen pronóstico en aquellos pacientes que lo expresan, respecto a los que no, teniendo estos últimos un tiempo de supervivencia aproximado de 6 meses menor que los primeros.

Sin embargo, otros autores han mostrado VEGF-A como un factor pronóstico en varios estudios en cáncer de pulmón<sup>182,188,189,194,203,204,219,345,367,368</sup>. Incluso un meta-análisis realizado por Delmotte y cols.<sup>215</sup> sobre 20 estudios publicados anteriores al año 2002, mostró que 15 de ellos relacionaban la expresión de VEGF con la disminución de la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón, revelando que la expresión de VEGF es un factor pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de pulmón, aunque, como ya observaran, existen estudios que no encuentran relación entre la expresión de VEGF-A y el pronóstico de la enfermedad<sup>192,208,209</sup>. Por otro lado, los trabajos que intentan relacionar distintos niveles de expresión de VEGF-A con el pronóstico no se han mostrado concluyentes hasta la fecha, ya que, mientras Giatromanolaki<sup>187</sup>, Niklinska<sup>198</sup> y cols. muestran una clara relación entre la disminución de la supervivencia y distintas intensidades de expresión de VEGF-A, Offersen<sup>200</sup>, Baillie<sup>211</sup> y cols. no encuentran esta relación, lo que puede deberse a los diferentes criterios para valorar la expresión de VEGF.

Al estudiar la expresión de VEGF-A según los estadios, se ha observado que los estadios iniciales (estadio I y II) muestran una disminución de la supervivencia en aquellos pacientes que expresan VEGF-A<sup>190,195,196,199,206,343,345</sup>, con algunas excepciones<sup>207,211,214,189</sup>. Sin embargo, en los estadios más avanzados (estadio III y IV) esto sólo se muestra en el estudio realizado por Yuan y cols.<sup>196</sup> en pacientes en estadio III, mientras que otros no muestran relación entre el pronóstico de la enfermedad y la expresión de VEGF-A<sup>211,213,345,346</sup>.

Esto parece indicar que la expresión de VEGF-A esta relacionada con la supervivencia sólo en los estadios iniciales del cáncer de pulmón respecto a los estadios más avanzados (III-IV), donde la expresión de VEGF-A puede ser necesaria pero no suficiente para producir la progresión tumoral y la metástasis, que van a ser procesos multifactoriales<sup>213,346</sup>.

Para el resto de los factores de la familia del VEGF sólo existen trabajos en pacientes con cáncer de pulmón referidos al VEGF-C, donde se ha observado que su expresión es un factor pronóstico de la enfermedad<sup>216-219,345</sup>, excepto en el estudio realizado por Renyi-Vamos y cols.<sup>337</sup> Al analizar la expresión de VEGF-C por estadios, sólo Huang y cols.<sup>345</sup> en pacientes en estadio I mostró una disminución de la supervivencia de los pacientes que lo expresaban, a diferencia de Ohta y cols.<sup>195</sup>, sin embargo, no encontró ninguna relación en los pacientes en estadios II y III. Los trabajos realizados en otros tipos tumorales para VEGF-D también han demostrado la disminución de la supervivencia en aquellos pacientes en los que se ha encontrado su expresión<sup>167,168,171,180,348,371</sup>, algo que nosotros no observamos cuando se expresa en las células tumorales, pero sí observamos, que se comporta como un factor de buen pronóstico cuando se expresa en las células endoteliales, como se ha comentado anteriormente.

Respecto a los receptores de la familia del VEGF, sólo la expresión de VEGFR3 se ha mostrado como un factor pronóstico, tanto su expresión en las células tumorales<sup>217,219</sup>, en las células endoteliales<sup>219</sup> y, en nuestro estudio, en el núcleo de las células tumorales, como ya se ha comentado. Sin embargo, Chen y cols.<sup>220</sup> encuentran que los niveles de expresión de VEGFR3 en las células endoteliales, pero no en las

células tumorales, es un factor pronóstico. Además, al estudiar el pronóstico y la expresión de VEGFR3 según el estadio, encontraron que la expresión de VEGFR3 en las células endoteliales de pacientes con estadio IIIA se comportaba como un factor pronóstico, algo que no sucedía en los pacientes con estadios I y II.

Los estudios realizados en VEGFR1 y VEGFR2 no han mostrado relación entre la expresión de estos factores y el pronóstico de la enfermedad<sup>182,192,207</sup>, excepto en nuestro trabajo y los realizados por Kajita y cols.<sup>216</sup>, que encontraron una disminución de la supervivencia en aquellos pacientes que expresaban VEGFR2 en las células endoteliales, hecho que no sucedía al estudiar la expresión en las células tumorales. Este hecho, contrasta con lo observado por nosotros, donde la expresión de VEGFR2 y sus niveles en las células tumorales y no en las células endoteliales, se comportan como un factor pronóstico, como ya se ha comentado. Además, Seto y cols.<sup>207</sup>, al analizar la expresión de VEGFR2 según el estadio, relacionaron la expresión de VEGFR2 como un factor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón en estadio I.

La combinación de la expresión de factores y receptores de la familia del VEGF en pacientes con cáncer de pulmón se ha identificado como factor de mal pronóstico en pacientes que expresan tanto el factor como el receptor, respecto a aquellos que expresan solo uno o ninguno<sup>193,207,217,219</sup>. Sin embargo, Takenaka y cols.<sup>369</sup> observaron que pacientes con un alto ratio de VEGFR1/VEGF-A mRNA tenían una mayor supervivencia que aquellos que tenían un ratio bajo. Esta relación entre la expresión de VEGFR1 y un mejor pronóstico ya fue observada anteriormente por Zhukova y cols.<sup>394</sup> en pacientes con cáncer de mama.

Todos los trabajos citados anteriormente se desarrollaron en pacientes intervenidos mediante cirugía, excepto el realizado por Ludovini y cols.<sup>213</sup>, y los estudios de supervivencia se desarrollaron al cabo de 5 años del diagnóstico en unos casos y en otros a los 5 años de realizarse la cirugía. Esto podría influir en las observaciones obtenidas en nuestro estudio, respecto a la expresión de los distintos factores y receptores de la familia del VEGF y su relación con el pronóstico del cáncer de pulmón, ya que, por un lado, se incluyen tanto pacientes quirúrgicos como no quirúrgicos, lo que va a influir en una distinta evolución y supervivencia de los

pacientes<sup>20</sup> y, por otro, que los pacientes incluidos en este trabajo sólo llevan 2 años de evolución.

Parece claro, por lo tanto, que las nuevas terapias en desarrollo basadas en la inhibición de la actividad de VEGF y sus receptores, podrían ayudar a obtener mejores resultados en el tratamiento del cáncer de pulmón de los obtenidos hasta hoy en día<sup>73</sup>. Los estudios realizados en fase III con el bevacizumab (Avastin<sup>TM</sup>, Genetech), un anticuerpo monoclonal frente a VEGF-A, en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado, han mostrado un aumento de la supervivencia administrado en combinación con el tratamiento quimioterápico convencional basado en la combinación de paclitaxel y carboplatino<sup>72</sup>. Otros inhibidores de la actividad de VEGF y VEGFRs se encuentran en fases avanzadas de desarrollo<sup>28,40,73</sup>.

La administración de estos fármacos permitiría, a priori, la “normalización” de la vasculatura tumoral favoreciendo una mejor difusión y eficacia de los agentes quimioterápicos sobre el tumor, dificultarían la repoblación de las células tumorales tras los descansos de los regímenes de quimioterapia, al comprobarse que los agentes antiangiogénicos, como el bevacizumab (Avastin<sup>TM</sup>, Genetech,), permanecen con altos niveles en la circulación sanguínea de dos a tres semanas tras su administración y, finalmente, reducirían el número de células progenitoras endoteliales en la circulación, impidiendo su diferenciación en el estroma tumoral, sin producir los efectos mielosupresores de la quimioterapia<sup>257</sup>.

Actualmente, el mayor interés se centra en identificar aquellos pacientes que pudieran ser más sensibles a este tipo de terapias y, por lo tanto, obtener un mayor beneficio de ellas, como lo serían aquellos pacientes candidatos a cirugía con expresión de factores o receptores de la familia del VEGF, que se podrían beneficiar de la administración de este tipo de terapias antiangiogénicas de forma adyuvante, anterior a la extirpación quirúrgica del tumor, o neoadyuvante, posterior a la cirugía<sup>395</sup>, como proponen algunos autores<sup>187,198,213</sup>.

La proteína VEGF es un péptido soluble que se ha detectado, al ser secretado por las células tumorales, en distintos fluidos corporales, como el suero, el plasma, el

líquido pleural o el líquido ascítico. El estudio de los niveles circulantes de VEGF parece ofrecer mayores ventajas que el estudio de expresión de la proteína del VEGF en tejido tumoral, por su mayor accesibilidad, disponibilidad y no requerir de una instrumentación invasiva para la obtención de la muestra clínica, lo que la hace ser más económica, rápida y con menos tendencia al rechazo<sup>254</sup>.

Los primeros en observar niveles elevados de VEGF en el suero de pacientes con cáncer respecto a personas sanas fueron Kondo y cols.<sup>396</sup> en 1994, lo que fue refrendado posteriormente por Yamamoto y cols.<sup>397</sup> en pacientes con distintos tipos de cáncer. Estos resultados sugerían que la actividad angiogénica global de los tumores se reflejaba en los niveles circulantes de VEGF en suero, lo que ha incrementado en los últimos años el interés del estudio de los niveles séricos de VEGF, para la determinación de su valor clínico como biomarcador e indicador pronóstico en distintos tipos de tumores.

En nuestro trabajo, los pacientes estudiados presentan niveles más elevados de VEGF en suero que los individuos sanos, al igual que lo observado en pacientes con cáncer de pulmón por otros autores<sup>189,233,234,236,239,243,246</sup>. Además, Hasegawa<sup>239</sup>, Trape<sup>234</sup> y cols. incluyendo pacientes con enfermedades pulmonares no tumorales, como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), han mostrado también que los niveles de VEGF en suero de estos pacientes son inferiores a los de los pacientes con cáncer de pulmón. Incluso Wasada y cols.<sup>398</sup> indican que el daño tisular producido por el tabaco en personas fumadoras no aumenta las concentraciones de VEGF circulante.

Esto hace pensar que la medición de los niveles circulantes de VEGF en el suero podría ser útil en la detección temprana de la enfermedad en poblaciones de riesgo a padecer cáncer de pulmón, como pueda ser la fumadora. Sin embargo, los diferentes protocolos de recogida y manipulación de las muestras se han visto que influyen en los niveles de VEGF circulante medidos<sup>225</sup>. Las distintas características de las plataformas utilizadas en los diferentes estudios<sup>226</sup>, junto con los distintos niveles de corte establecidos en cada estudio mediante diferentes criterios<sup>64</sup> y las altas desviaciones estándar que se obtienen<sup>246</sup>, dificultan la utilización de los niveles de VEGF en suero como marcador biológico.

Las diferencias encontradas en el tamaño tumoral, donde los tumores mayores de 5,4 cm tienen mayores niveles de VEGF en suero y una menor supervivencia que los tumores menores de 5,4 cm, ya fue observada anteriormente por algunos autores entre tumores mayores y menores de 3 centímetros<sup>231,232</sup>. El tamaño tumoral estudiado anteriormente por Jefferson y cols.<sup>399</sup> ya se ha observado como un factor de mal pronóstico de los pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico. Esto nos hace pensar que los niveles preoperatorios de VEGF en suero podrían tener un valor pronóstico, aunque al estratificar con unos niveles de corte de 493,93 pg/ml no hemos conseguido observar diferencias en la supervivencia, lo que podría deberse a que el nivel de corte establecido no sea el más adecuado para utilizar los niveles de VEGF en suero como valor predictivo, como proponen Brattstrom y cols<sup>232</sup>.

Nuestro trabajo muestra una clara relación entre los niveles de VEGF en suero y el estadio de los pacientes. Los pacientes en estadios más precoces (I, II) y, por lo tanto, candidatos a la resección quirúrgica, tienen niveles menores de VEGF en suero respecto a los estadios más avanzados (III, IV), considerados como “irreseables”, algo también observado por otros autores<sup>189,227,229-231,233,238,239</sup>. Estas diferencias parecen explicar, que los pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico muestren niveles más bajos de VEGF en suero que aquellos cuyo tratamiento fue realizado mediante quimioterapia con o sin radioterapia<sup>233,236</sup>. Sin embargo, algunos estudios no han encontrado relación entre los niveles de VEGF en suero y el estadio, principalmente debido a que se realizan en poblaciones no homogéneas, con escaso número de pacientes en estadios I y II, y un alto número de pacientes en estadios III y IV<sup>234-236,242,246,253</sup>.

La disminución de la supervivencia que observamos en aquellos pacientes con niveles altos de VEGF en suero es algo ya mencionado por otros autores<sup>232,233,236,238,239,253</sup>, aunque en algunos estudios no se ha observado esta relación<sup>189,234,242</sup>, lo que parece deberse a que los pacientes analizados en estos trabajos fueran todos estadios III y IV, y los niveles de VEGF en suero sólo se comportarían como un factor pronóstico en los estadios más precoces, tal y como proponen Shimanuki y cols.<sup>238</sup> De hecho, los datos obtenidos en nuestro trabajo al estratificar por estadios y los estudios realizados en este sentido por Laack<sup>233</sup>, Salven<sup>253</sup> y cols. coinciden en que los pacientes con niveles altos de VEGF en los estadios más precoces



(I-II) tienen un peor pronóstico que aquellos con niveles inferiores, hecho que no se observa en los estadios más avanzados (III-IV).

Estos resultados, junto con las diferencias que observamos en los pacientes con tumores no microcíticos, donde los pacientes con niveles de VEGF en suero mayores de 434,93 pg/ml tienen una menor supervivencia que los pacientes con niveles inferiores, parecen dejar claro que los pacientes candidatos a tratamiento quirúrgico, generalmente tumores de tipo no microcítico y en estadios bajos<sup>28</sup> con niveles altos de VEGF, se podrían beneficiar de la administración de terapias antiangiogénicas de forma adyuvante o neoadyuvante, como ya se ha comentado anteriormente. Además, la cuantificación de VEGF en suero en el seguimiento del paciente tras la cirugía podría permitir la evaluación de posibles recidivas como proponen algunos autores<sup>189,250</sup>, ya que, aunque los niveles de VEGF en suero se elevan inmediatamente tras la cirugía por encima de los niveles preoperatorios como respuesta a procesos de hipoxia<sup>250</sup>, tienden a descender con el tiempo y a volver a elevarse en caso de recidiva<sup>189,397,400</sup>. Los estudios realizados en modelos animales muestran que la elevación de los niveles de VEGF tras la resección del tumor primario induciría el crecimiento de metástasis hasta ese momento silentes, que se podrían inhibir con la administración de un fármaco antiangiogénico<sup>250</sup>.

Parece claro, por lo tanto, que la elevación de los niveles séricos de VEGF refleja el estado del crecimiento y la diseminación tumoral que conllevan un peor pronóstico, sobre todo en los estadios iniciales. La introducción de este parámetro en la evaluación de los pacientes con cáncer de pulmón, tras la realización de los estudios necesarios para solucionar los problemas asociados a la medición de los niveles de VEGF en suero<sup>64,225,226,246</sup>, ya comentados anteriormente, podrían llevar a una mejor estadificación de los tumores y a orientar en la elección de la mejor opción de tratamiento, incluyendo estrategias terapéuticas basadas en la inhibición o el bloqueo del proceso de neoangiogénesis<sup>257</sup>, actualmente en fase de desarrollo e implantación<sup>28,40,73</sup>. Esto, junto con las ventajas de ser una técnica no invasiva, altamente accesible, económica y reproducible<sup>254</sup> hace de este campo uno de los más interesantes para su estudio y aplicación clínica en los próximos años.

Finalmente, en la última parte de este trabajo se emplearon métodos de micromatrices de oligonucleótidos y herramientas bioinformáticas con el objetivo de identificar nuevos genes candidatos a marcadores tumorales. Lamentablemente, durante el tiempo en que se ha desarrollado este trabajo, la escasez de marcadores específicos es generalizada para la mayoría de tumores sólidos. En este sentido, los experimentos de *microarrays* para obtener perfiles de expresión génica y el desarrollo y aplicación de herramientas bioinformáticas, imprescindibles para el análisis del gran volumen de datos generados por éstos, son poderosas herramientas para tratar de comprender los mecanismos moleculares de los tumores<sup>401,402</sup>. El hecho de poder estudiar de forma simultánea los niveles de expresión de miles de genes, es la causa de que los *microarrays* sean empleados cada vez con mayor asiduidad, con el objetivo de encontrar y proponer nuevos genes candidatos cuyos niveles de expresión sean indicativos de la evolución de una determinada enfermedad y, en función de éstos, aplicar un tratamiento más preciso.

Actualmente, en el caso del carcinoma de pulmón y de forma rutinaria, ningún antígeno es empleado como marcador clínico con propósito diagnóstico. Por esta razón, la búsqueda y definición de nuevos marcadores moleculares se hace imprescindible en un intento por mejorar el diagnóstico.

El interés de seleccionar pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón para este estudio se debe a la observación en trabajos previos de que el adenocarcinoma es el tipo histológico que presenta mayor variabilidad en su comportamiento clínico y biológico<sup>297,299</sup>.

Los controles de calidad a los que se sometieron las muestras, que fueron superados en todos los casos, la alta reproducibilidad de la plataforma utilizada<sup>326</sup>, y la similitud entre los perfiles obtenidos en este estudio y otros previos para distintos genes, como por ejemplo para CAV1, CAV2, AGER, CHI3L2, LTAH4, CYB5, S100A2, ALOX-5, PTEN, COL11A1, STK6, TOP2A1, MMP1, MMP12, CAT<sup>297,298,305,312,317,403-408</sup> apoyan la verosimilitud de los perfiles de expresión génica diferencial mostrados.

Por otro lado, la disminución de la expresión génica global mostrada por las muestras de adenocarcinoma analizadas, respecto a las muestras de tejido sano ya fue observada por Hellmann y cols.<sup>409</sup>, entre muestras de tejido sano y la línea celular A549 obtenida a partir de un adenocarcinoma de pulmón. Sin embargo, esta disminución de la expresión génica global es relativa, ya que sólo estudian 588 genes y en nuestro caso 8.500 genes, apenas el 28% de todo el genoma humano.

Las diferencias encontradas entre la expresión génica de los tejidos sanos y los tejidos tumorales, según se consideraran expresados o no expresados, se relacionan con la expresión de genes involucrados en la división celular y la apoptosis en los tejidos tumorales, como por ejemplo; UBEC2C, implicado en la destrucción de la ciclina al final de la mitosis para que la célula pueda entrar en otro ciclo de división<sup>410</sup>, TOP2A, esencial para la segregación de los cromosomas en la mitosis<sup>411</sup>, y que se ha observado altamente expresada en tumores pulmonares en distintos estudios<sup>317,403,405,407,408</sup>, NEK2, STK6, CENPE y PRC1, implicados en la regulación del centrosoma<sup>412-415</sup>, TTK, CDC20, SPAG5, TPX2 y CCNE2 reguladores de las distintas fases de la división celular<sup>416-420</sup> y BIRC5, implicado en la inhibición de la apoptosis<sup>421</sup>. Además, se encontró el aumento de la expresión de genes relacionados con la remodelación tisular, la invasión y la metástasis como por ejemplo; ADAM28, MMP1, MMP12 y MAP2K2<sup>408,422-427</sup>, hecho ya observado por otros autores<sup>317,406,407</sup>, junto con un incremento de la síntesis de colágeno, como por ejemplo; COL10A1, COL11A1 y COL16A1, cuyo exceso esta presente en muchos tumores del tipo no microcítico y parece relacionarse con una peor evolución clínica<sup>406</sup>.

Por el contrario, genes supresores de tumores como PTEN y S100A2<sup>427,428</sup>, genes relacionados con células del componente inflamatorio, como AGER, IL-18, MME, EPHB6, MAP3K14 y REL<sup>429-434</sup>, así como, genes relacionados con las células epiteliales del pulmón como TFC21 y PRKCD<sup>435,436</sup>, implicada esta última en la secreción de mucina, se encuentran expresados principalmente en los tejidos sanos, respecto a los adenocarcinomas.

Al analizar los resultados de la expresión génica en los tejidos peritumorales, podemos observar principalmente la aparición de moléculas relacionadas con la

remodelación tisular como ADAM28, MMP1 y MMP12, respecto al tejido sano, que ya habíamos visto anteriormente se expresaban preferentemente en tejido tumoral respecto al tejido sano. Esto parece estar relacionado con la necesidad de preparar el asentamiento y crecimiento de las células tumorales, como proponen algunos autores como Nakamura y cols.<sup>406</sup> y, además, esta función la podrían llevar a cabo células del sistema inmune y fibroblastos, antes de la llegada de las células tumorales<sup>139</sup>. De hecho, estos factores se han encontrado expresados por células del sistema inmune<sup>437-439</sup> y fibroblastos<sup>440</sup>. Esta remodelación del estroma permitiría la activación de los procesos angiogénicos previos al asentamiento tumoral, que permitirían la migración de células precursoras endoteliales y el desarrollo de nuevos vasos para la nutrición y oxigenación de las células tumorales, algo que parece que ocurre en el tejido peritumoral al encontrar expresado PROM1, marcador de células precursoras endoteliales<sup>441</sup> y, recientemente considerado como posible marcador de células madre tumorales en tumores sólidos<sup>442</sup>. Además, se observa la expresión de COL7A1, lo que parece indicar el inicio del depósito de colágeno.

Esto induce a pensar que en el crecimiento tumoral no sólo van a participar las células tumorales, sino también el resto de células circundantes, por lo que parece que el análisis de factores implicados en la remodelación del estroma pulmonar, como el colágeno y los MMPs, y sus distintos tipos, podrían ser de interés como posibles marcadores tumorales, junto con otros factores inhibidos, como PTEN o S100A2, este último, silenciado mediante la hipermetilación de su promotor durante las primeras fases del desarrollo del cáncer de pulmón<sup>428</sup>.

Numerosos autores han apuntado la necesidad de aplicar métodos de inferencia estadística en los estudios de microarrays (t-test, la prueba de Wilcoxon, la U de Mann-Whitney, ANOVA, entre otros) para los análisis de expresión diferencial<sup>443,444</sup>. Con este objetivo se aplicó la prueba ANOVA entre los tres tipos de tejido estudiado y se obtuvieron 24 genes cuyos valores de expresión se encontraron diferencialmente expresados con un nivel de significancia estadística predeterminada ( $p \leq 0,05$  en este caso), tras haber ajustado los resultados mediante el método de Bonferroni<sup>327</sup> para controlar el FWER. Además, el estudio de hasta 10 replicados por cada tipo de muestra y el método estadístico utilizado excluye la posibilidad de obtener genes

diferencialmente expresados, que se deban a variaciones intra-individuales en la expresión entre las distintas muestras de cada tipo de tejido analizado.

Entre los 24 genes seleccionados podemos encontrar genes supresores de tumores e implicados en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular como CAV1, CKAP4, CLIC3, HLF y PPARG<sup>445-449</sup>, genes implicados en procesos de oxidación/reducción como ACADL, CAT, CYB5<sup>450-452</sup>, genes implicados en la adhesión celular como ANXA3, CDW52, CLDN18, RTEN, STAC, TREM1 y el clon DKFZp434C2112<sup>453-458</sup>, genes implicados en el metabolismo de los leucotrienos, la biosíntesis de ergosterol y el metabolismo de la glucosa como ALOX5, ALOX5AP, LTA4H, CYP51A1 y FBP1<sup>459-463</sup> y genes que codifican para proteínas transportadoras como AQP4 y SLC35A1<sup>464,465</sup>. Muchos de estos genes se expresan principalmente en las células del componente inflamatorio como ALOX5, ALOX5AP, ANXA3, CDW52, LTAH4, RTEN y TREM1<sup>453,454,456,457,459,460,466</sup> y en las células epiteliales del pulmón como AQP4, CAT, CAV1, CAV2, CKAP4, CLDN18 y LTAH4<sup>445,446,451,455,464,467</sup>.

Algunos de estos genes, como CAV1, CAV2, ALOX5, LTA4H y CYB5, ya se encontraron diferencialmente expresados entre el tejido sano y adenocarcinomas de pulmón en otros trabajos<sup>297,317,405,406</sup>.

Sólo el gen CKAP4 y el clon FLC1492 PRO3121 mRNA relacionado con el colágeno tipo III alfa 1 (COL3A1), se encontraron sobreexpresados en el tejido tumoral respecto al tejido sano. CKAP también denominado p63 y miembro de la familia de los factores nucleares de transcripción p53, se ha relacionado con la regulación de la diferenciación y la división que tiene lugar en células proliferativas y, la inducción de la diferenciación de tipo escamosa. La expresión de CKAP4 se ha observado en las células proliferativas de la capa basal del epitelio bronquial por distintos estudios; sin embargo, no se expresa en las células del epitelio alveolar, como las células de Clara y los neumocitos tipos I y II<sup>468,469</sup>. Además, su expresión se ha observado principalmente en tumores de pulmón de tipo epidermoide y en algunos adenocarcinomas, en lo que parece una activación aberrante de la diferenciación escamosa durante el desarrollo tumoral de estos últimos, según proponen Wang y cols.<sup>468</sup>, lo que parece indicar un

posible origen común para los tumores epidermoides y adenocarcinomas de pulmón<sup>468,469</sup>.

El aumento de la expresión del clon FLC1492 PRO3121 mRNA, relacionado con COL3A1, en los adenocarcinomas parece relacionarse con un incremento de la producción de matriz extracelular llevada a cabo por los fibroblastos intersticiales próximos al tumor, como proponen Nakamura y cols.<sup>406</sup>, lo que podría favorecer el asentamiento, crecimiento y diseminación del tumor.

El reducido número de genes diferencialmente expresados, entre los distintos tipos de tejidos, que obtenemos al aplicar métodos estadísticos cuando anteriormente hemos mostrado un mayor número de genes diferencialmente expresados, parece ser debido a la aplicación de métodos distintos para considerar un gen diferencialmente expresado o no, y que, al aplicar el método de Bonferroni para controlar el FWER reducimos la posibilidad de obtener falsos positivos asumiendo un alto número de falsos negativos<sup>470</sup>. Sin embargo, los perfiles de expresión de estos 24 genes para cada tejido estudiado permite separar perfectamente las muestras de tejido sano de las de tejido tumoral, mediante métodos de agrupamiento no supervisados como el algoritmo de agrupamiento jerarquizado y el análisis por componentes principales (ACP), algo que sólo se había podido observar con el análisis de varios miles y/o cientos de genes<sup>297,299-301,317,403,407</sup>.

La diferente agrupación de los distintos tejidos peritumorales, 2 con los tejidos tumorales, y el resto agrupados con los tejidos sanos, pero de manera independiente, según el algoritmo de agrupamiento jerarquizado, y de una manera escalonada, según el ACP, parece indicarnos la transformación del tejido circundante y próximo al tumor morfológicamente sano, junto con la posible presencia de células tumorales, algo que sólo pudo ser confirmado histológicamente en 4 de los tejidos en los que se conservaba muestra en parafina próxima a la que se realizó la técnica de *microarrays*, mientras que en otros 5 tejidos no se pudo demostrar la presencia de células tumorales.

Esto parece indicar que aquellos pacientes estudiados por sospecha de adenocarcinoma de pulmón y cuyo análisis histológico de las biopsias obtenidas no

muestran presencia de células tumorales, pero que pudieran presentar un perfil de expresión para estos 24 genes que las clasifique de forma independiente a los tejidos sanos, podrían beneficiarse de la aplicación de estas tecnologías al recomendarse un estudio y seguimiento más exhaustivos de la posible presencia tumoral.

Por lo tanto, estudios de expresión en estos 24 genes en un mayor número de casos y la confirmación de estos resultados mediante técnicas de PCR, podrían permitir en un futuro la aplicación del estudio de los perfiles de expresión de estos genes en el diagnóstico del adenocarcinoma de pulmón.

El estudio de genes relacionados con el proceso de neoangiogénesis, según los encontramos expresados o no, mostró la expresión de genes implicados en la remodelación de la matriz extracelular como ADAM28, MMP1 y MMP12, ya comentados anteriormente, y la expresión de ANGPT2 implicada en el desarrollo de neovasos<sup>471</sup>, en los tejidos tumorales respecto a los tejidos sanos. Esto permite en primer lugar la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos y la disgregación localizada de la matriz extracelular por metaloproteasas de la matriz (MMPs)<sup>55</sup>, con la posterior liberación de moléculas pro-angiogénicas retenidas en la matriz extracelular. El proceso se completa con la remodelación de la estructura capilar y el depósito de una nueva matriz extracelular<sup>56</sup>. En este sentido, y como ya se ha comentado anteriormente, también se observa, la expresión de genes relacionados con el colágeno como COL10A1, COL11A1 y COL16A1. En el tejido peritumoral, se observa la expresión de ADAM28, MMP1, MMP12, COL7A1 y PROM1, este último marcador de células precursoras endoteliales<sup>441</sup>, en relación al tejido sano, lo que parece indicar que los procesos de disgregación de la matriz extracelular y su remodelación se producen en el tejido circundante al tumor, favoreciendo su posterior crecimiento y diseminación.

Al seleccionar los genes implicados en el proceso de angiogénesis según el *gene ontology*, sólo VEGF-D mostró diferencias significativas entre los 3 tipos de tejido. La expresión de VEGF-D se observó que disminuía en el tejido tumoral respecto al sano, algo observado ya anteriormente por Niki y cols.<sup>336</sup> mediante PCR, que además, constataron una disminución de los niveles de VEGF-D en los adenocarcinomas de

pulmón con diseminación a ganglios, respecto a aquellos que no habían diseminado, lo que atribuían a un posible efecto antimetastásico de VEGF-D.

Por el contrario, al estudiar la expresión de la proteína VEGF-D mediante técnicas inmunohistoquímicas pudimos observar su expresión en todos los tejidos tumorales analizados mediante *microarrays* y con diversas intensidades, esto es algo ya observado por Wikman y cols.<sup>405</sup> para CAV1 y CAV2. Estos autores, observaron la disminución de la expresión del mRNA en el tejido tumoral analizado respecto al tejido sano pero, tras analizar la expresión de la proteína más de la mitad de los tumores estudiados expresaban ambas proteínas y con distintas intensidades. Estos resultados los justificaron mediante la abundante expresión proteica de las caveolinas encontradas en el endotelio capilar del tracto respiratorio y en los neumocitos de tipo I de las muestras analizadas.

Sin embargo, la diferente expresión encontrada para el mRNA y la proteína de VEGF-D entre el tejido sano y tumoral analizados, podría deberse a modificaciones post-transcripcionales que pueden tener influencia en los niveles de la proteína en distintos tejidos. En este sentido Chen y cols.<sup>472</sup>, estudiando 165 proteínas en adenocarcinomas de pulmón mostraron que sólo en el 17% de ellas encontraban correlación entre los niveles de expresión del mRNA y la proteína, por lo que, sólo en estos casos, la abundancia de la proteína parecía ser regulada de manera transcripcional, lo que parece indicar que los niveles de expresión del resto de proteínas parecían estar bajo la influencia de mecanismos post-transcripcionales. De hecho, genes con niveles de mRNA comparables mostraban unas diferencias de hasta 24 veces en su expresión proteica y, proteínas con niveles comparables de expresión presentaban una variabilidad de hasta 28 veces en los niveles de mRNA.

Esto demuestra la importante influencia que tienen los mecanismos post-transcripcionales en los niveles de expresión de muchas proteínas, así como la importancia de validar los resultados obtenidos mediante el estudio de la expresión génica usando diferentes métodos, especialmente a nivel celular.



A pesar de esto, los hallazgos obtenidos en este estudio sugieren la utilización de perfiles de expresión génica en el diagnóstico del adenocarcinoma de pulmón y como posibles dianas terapéuticas para este tipo de tumores. Aunque se trata de una aproximación, esta estrategia podría extenderse al resto de las estirpes histológicas del cáncer de pulmón y a cualquier otro tipo de tumor sólido, poniendo de manifiesto el potencial de la aplicación de los estudios de *microarrays* como complemento a la labor clínica habitual.





## **6. CONCLUSIONES**

---



- 1.- La expresión de VEGF-A, VEGF-D y VEGFR1, en el tejido pulmonar histológicamente normal de pacientes con cáncer de pulmón, parece ser una etapa precoz en el proceso de neoangiogénesis.
- 2.- La expresión de los receptores de la familia del VEGF en las células tumorales de casi la totalidad de las neoplasias analizadas, sugiere que, además de la regulación paracrina ya conocida, podría existir otra de tipo autocrino implicada en el crecimiento tumoral. Por otro lado, el alto número de pacientes que expresan alguno de los factores y receptores de la familia del VEGF indican que la neoangiogénesis es un proceso fundamental en el cáncer de pulmón.
- 3.- La diferente expresión observada al estudiar los factores y receptores de la familia del VEGF en el tejido tumoral según la edad del paciente, el tamaño del tumor, la estirpe histológica y el estadio, parece estar relacionada con el diferente comportamiento de los tumores y la evolución de los pacientes. Estudios más exhaustivos podrían conducir a la inclusión del análisis de estos factores en la estadificación del cáncer de pulmón, que podrían ayudar, como observamos para la expresión de VEGF-D, VEGFR1 y VEGFR2, a una evaluación y clasificación más certera de los tumores pulmonares, así como, a la elección del tratamiento más adecuado.
- 4.- El estudio de los niveles circulantes de VEGF-A parece ofrecer mayores ventajas que el estudio de expresión de la proteína del VEGF-A en tejido tumoral, por ser una técnica no invasiva, altamente accesible, económica, reproducible y con menos tendencia al rechazo. La elevación de los niveles séricos de VEGF-A, en pacientes con cáncer de pulmón, parece reflejar el estado del crecimiento y la diseminación tumoral que conllevan un peor pronóstico, sobre todo en los estadios iniciales. La introducción de este parámetro en la evaluación de los pacientes con cáncer de pulmón, tras la realización de los estudios necesarios para solucionar los problemas asociados a la medición de los niveles de VEGF en suero, podría llevar a una mejor estadificación de los tumores y a orientar en la elección de la mejor opción de tratamiento.

- 5.- La aplicación de técnicas de *microarrays*, en muestras de tejido sano, peritumoral y tumoral, de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, nos permitieron analizar 8.500 genes, cuya validación estadística mediante el análisis de replicados, y la posterior aplicación de herramientas bioinformáticas, como los algoritmos de agrupamiento, nos han permitido identificar un panel de 24 genes (ACADL, ALOX5, ALOX5AP, ANXA3, AQP4, CAT, CAV1, CAV2, CDW52, cDNA DKFZp434C2112, CKAP4, CLDN18, CLIC3, clone FLC1492 PRO3121 mRNA, CYB5, CYP51A1, FBP1, HLF, LTA4H, PPARG, RETN, SLC35A1, STAC, TREM1), cuya expresión diferencial distingue entre los tejidos de adenocarcinoma de pulmón de los tejidos sanos. Este trabajo, pone de manifiesto el potencial de aplicación de estos hallazgos como complemento a la labor clínica habitual.
- 6.- El análisis de un abundante número de genes (8.500) mediante *microarrays*, nos ha permitido seleccionar los genes relacionados con el proceso de neoangiogénesis y estudiar aquellos diferencialmente expresados entre tejidos sanos, peritumorales y tumorales. Los genes diferencialmente expresados e implicados en la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos (MMPs), la remodelación de la matriz extracelular (MMPs y COLs) y el desarrollo de neovasos (ANGPT2, PROMC) indican, que el proceso de neoangiogénesis es fundamental para el desarrollo, crecimiento y posterior diseminación del tumor.







## **7. BIBLIOGRAFÍA**

---



1. **World Health Statistics 2006.** *World Health Organization.* 2006.  
(<http://www.who.int/whosis/whostat2006/en/index.html>)
2. Boyle P. and Ferlay J. **Cancer incidence and mortality in Europe 2004.** *Annals of Oncology* 16: 481-488. 2005.
3. Mathers C.D. and Loncar D. **Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results.** Geneva, *World Health Organization.* 2005  
(<http://www.who.int/healthinfo/statistics/bodprojections2030/en/index.html>)
4. Hernández J.R. and Izarzugaza M.I. **Epidemiología del cáncer de pulmón en España.** *Monografías NEUMOMADRID: Cáncer de pulmón.* Vol. III:5-18. 2002
5. Smith R.A. and Glynn T.J. **Epidemiology of lung cancer.** *Radiologic Clinics of North America.* 38(3):453-70. 2000
6. Mannino D.M., Ford E., Giovino G.A. and Thun M. **Lung Cancer mortality rates in birth cohorts in the United States from 1960 to 1994.** *Lung Cancer.* 31:91-99. 2001
7. Reid A., de Klerk N.H., Ambrosini G.L., Berry G. and Musk A.W. **The risk of lung cancer with increasing time since ceasing exposure to asbestos and quitting smoking.** *Occupational and Environmental Medicine.* 63(8):509-512. 2006
8. Hackshaw A.K., Law M.R. and Wald N.J. **The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke.** *British Medical Journal.* 315:980-988. 1997
9. Gorlova O.Y., Zhang Y., Schabath M.B., Lei L., Zhang Q., Amos C.I. and Spitz M.R. **Never smokers and lung cancer risk: a case-control study of epidemiological factors.** *International Journal of Cancer.* 118(7):1798-1804. 2006
10. Yamaguchi N., Mochizuki-Kobayashi Y. and Utsunomiya O. **Quantitative relationship between cumulative cigarette consumption and lung cancer mortality in Japan.** *International Journal of Epidemiology.* 29(6):963-968. 2000
11. Gledovic Z., Bojovic O. and Pekmezovic T. **The pattern of lung cancer mortality in Montenegro.** *European Journal of Cancer Prevention.* 12(5):373-376. 2003
12. Agudo A., Barnadas A., Pallares C., Martinez I., Fabregat X., Rosello J., Estape J., Planas J. and Gonzalez C.A. **Lung cancer and cigarette smoking in women: a case-control study in Barcelona (Spain).** *International Journal of Cancer.* 59(2):165-169. 1994

13. Bilello K.S., Murin S. and Matthay R.A. **Epidemiology, Etiology, and Prevention of Lung Cancer.** *Clinics in Chest Medicine.* 23(1):1-25. 2002
14. Schwartz A.G., Yang P. and Swanson G.M. **Familial Risk of Lung Cancer among Nonsmokers and Their Relatives.** *American Journal of Epidemiology.* 144(6):554-562. 1996
15. Wu A.H., Fontham E.T.H., Reynolds P., Greenberg R.S., Buffler P., Liff J., Boyd P. and Correa P. **Family History of Cancer and Risk of Lung Cancer among Lifetime Nonsmoking Women in the United States.** *American Journal of Epidemiology.* 143(6):535-542. 1996
16. Matakidou A., Eisen T. and Houlston R.S. **Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk.** *British Journal of Cancer.* 93(7):825-833. 2005
17. Hirayama T. **Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan.** *Bulletin of the World Health Organization.* 78(7):940-942. 2000
18. Lam W.K. **Lung cancer in Asian women-the environment and genes.** *Respirology.* 10(4):408-17. 2005
19. Travis W.D. **Pathology of Lung Cancer.** *Clinics in Chest Medicine.* 23(1):65-81. 2002
20. Mountain C.F. **Staging Classification of Lung Cancer: A Critical Evaluation.** *Clinics in Chest Medicine.* 23(1):103-121. 2002
21. Callol L., Roig F. and Gómez de Terreros F.J. **Diagnóstico precoz del cáncer de pulmón.** *Monografías NEUMOMADRID: Cáncer de pulmón.* Vol. III: 33-46. 2002
22. Mulshine J.L., Cuttitta F., Tockman M.S. and De Luca L.M. **Lung Cancer: Evolution to Pre-invasive Management.** *Clinics in Chest Medicine.* 23(1):37-47. 2002
23. Petty T.L., Tockman M.S. and Palcic B. **Diagnosis of Roentgenographically Occult Lung Cancer by Sputum Cytology.** *Clinics in Chest Medicine.* 23(1):59-63. 2002
24. Spiro S.G and Silvestri G.A. **One Hundred Years of Lung Cancer.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 172:523-529. 2005

25. Humphrey L.L, Teutsch S. and Johnson M. **Lung Cancer Screening with Sputum Cytologic Examination, Chest Radiography, and Computed Tomography: An Update for the U.S. Preventive Services Task Force.** *Annals of Internal Medicine.* 140(9):740-753. 2004
26. Diederichs S. and Wormanns D. **Impact of low-dose CT on lung cancer screening.** *Lung Cancer.* 45(Suppl. 2):S13-S19. 2004
27. Porta R.R., Navarro M.M. and Pont G.G. **Estadios tumorales, estadificación clínica y patológica. Pronóstico.** *Monografías NEUMOMADRID: Cáncer de pulmón.* Vol. III: 71-95. 2002
28. Johnson P.H. and Kim E.S. **Update on Approaches to the Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer.** *Oncology Special Edition.* 8:133-137. 2005
29. Raez L.E. and Lilenbaum R. **Management of Small-Cell Lung Cancer.** *Oncology Special Edition.* 8:175-179. 2005
30. Calvo J.P. **Marcadores tumorales y biología molecular; estado actual en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de pulmón.** *Monografías NEUMOMADRID: Cáncer de pulmón.* Vol. III: 58-70. 2002
31. Fong K.M, Sekido Y., Gazdar A.F. and Minna J.D. **Lung Cancer · 9: Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications.** *Thorax.* 58:892-900. 2003
32. Hecht S.S. **Cigarette Smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention.** *Lancet Oncology.* 3:461-469. 2002
33. Kiyohara C., Otsu A., Shirakawa T., Fukuda S. and Hopkin J.M. **Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review.** *Lung Cancer.* 37:241-256. 2002
34. Kaye F.J. **Molecular Biology of Lung Cancer.** *Lung Cancer.* 34:S35-S41. 2001
35. Apolinario R.M., Van Der Valk P., de Jong J.S., Deville W., van Ark-Otte J., Dingemans A.M., van Mourik J.C., Postmus P.E., Pinedo H.M. and Giaccone G. **Prognostic value of the expression of p53, bcl-2 and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer.** *Journal of Clinical Oncology.* 15:2456-2466. 1997
36. Wistuba II, Gazdar A.F. and Minna J.D. **Molecular genetics of small cell lung carcinoma.** *Seminars in Oncology.* 28(2Suppl4):3-13. 2001

37. Schiller J.H., Adak S., Feins R.H., Keller S.M., Fry W.A., Livingston R.B., Hammond M.E.M., Wolf B., Sabatini L., Jett J., Kohman L., Johnson D.H. **Lack of prognostic significance of p53 and K-ras mutations in primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: a Laboratory Ancillary Study on an Eastern Cooperative Oncology Group Prospective Randomized Trial of Postoperative Adjuvant Therapy.** *Journal of Clinical Oncology*. 19:448-457. 2001
38. Kwiatkowski D.J., Harpole D.H. Jr, Godleski J., Herndon J.E., Shieh D.B., Richards W., Blanco R., Xu H.J., Strauss G.M. and Sugarbaker D.J. **Molecular pathologic substaging in 244 stage I non-small-cell lung cancer patients: clinical implications.** *Journal of Clinical Oncology*. 16:2468-2477. 1998
39. Monzó M., Rosell R., Sánchez J.J., Lee J.S., O'Brate A., González-Larriba J.L., Alberola V., Lorenzo J.C., Núñez L., Ro J.Y. and Martín C. **Paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer associated to beta-tubulin gene mutations.** *Journal of Clinical Oncology*. 17:1786-1793. 1999
40. Herbst R. S. **Established and Promising Salvage Therapies for Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer.** *Oncology Special Edition*. 8:141-146. 2005
41. Greenblatt M. and Shubik P. **Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique.** *Journal of the National Cancer Institute*. 41:111-124. 1968
42. Algire G.H. and Chalkley H.W. **Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic implants.** *Journal of the National Cancer Institute*. 6:73-85. 1945
43. Warren B.A. and Shubik P. **The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch.** *Laboratory Investigation*. 15:464-478. 1966
44. Folkman J., Merler E., Abernathy C. and Williams G. **Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.** *The Journal of Experimental Medicine*. 133:275-288. 1971
45. Folkman J. **Tumor angiogenesis factor.** *Cancer Research*. 34:2109-2113. 1974
46. Folkman J. **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** *The New England Journal of Medicine*. 285:1182-1186. 1971

47. Folkman J. **Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors.** *Annals of Surgery.* 175:409-416. 1972
48. Folkman J. **What is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent?** *Journal of the National Cancer Institute.* 82(1):4-6. 1990
49. Leibovich S.J., Polverini P. J., Shepard H.M, Wiseman D.M., Shively V. and Nuseir N. **Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- $\alpha$ .** *Nature.* 329:630-632. 1987
50. Van Kempen L.C.L., de Visser K.E., Coussens L.M. **Inflammation, proteases and cancer.** *European Journal of Cancer.* 42:728-734. 2006
51. Lewis C.E. and Pollard J.W. **Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments.** *Cancer Research.* 66:605-612. 2006
52. Hlatky L., Tsionou C., Hahnfeldt P. and Coleman C.N. **Mammary fibroblast may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced Vascular Endothelial Growth Factor up-regulation and protein expression.** *Cancer Research.* 54:6083-6086. 1994
53. Kalluri R and Zeisberg M. **Fibroblasts in cancer.** *Nature Reviews in Cancer.* 6(5):392-401. 2006
54. Koshida Y., Kuranami M. and Watanabe M. **Interaction Between Stromal Fibroblasts and Colorectal Cancer Cells in the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor.** *Journal of Surgical Research.* 134:270-277. 2006
55. John A. and Tuszynski G. **The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis.** *Pathology Oncology Research.* 7(1):14-23. 2001
56. Gupta M.K. and Qin R. **Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis.** *World Journal of Gastroenterology.* 9(6):1144-1155. 2003
57. Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L. and Alitalo K. **Regulation of angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors.** *Cancer Research.* 60:203-212. 2000
58. Ushijima C., Tsukamoto S., Yamazaki K., Yoshino I., Sugio K. and Sugimachi K. **High vascularity in the peripheral region of non-small cell lung cancer tissue is associated with tumor progression.** *Lung Cancer.* 34(2):233-241. 2001
59. Jain R.K. **Tumor angiogenesis and accessibility: Role of Vascular Endothelial Growth Factor.** *Seminars in Oncology.* 29(6):3-9. 2002



60. Folkman J., Watson K., Ingber D. and Hanahan D. **Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia.** *Nature.* 339:58-61. 1989
61. Hiroshima K., Iyoda A., Shibuya K., Hoshino H., Haga Y., Toyokazi T., Shiba M., Baba M., Fujisawa T. and Ohwada H. **Evidence of Neoangiogenesis and Increase in the Number of Proliferating Cells within the Bronchial Epithelium of Smokers.** *Cancer.* 95:1539-1545. 2002
62. Keith R.L., Miller Y.E., Gemmill R.M., Drabkin H.A., Dempsey E.C., Haney J., Kennedy T.C., Prindiville S. and Franklin W.A. **Angiogenic Squamous Dysplasia in Bronchi of Individuals at High Risk for Lung Cancer.** *Clinical Cancer Research.* 6:1616-1625. 2000
63. Merrick D.T., Haney J., Petrunich S., Sugita M., Miller Y.E., Keith R.L., Kennedy T.C. and Franklin W.A. **Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis.** *Lung Cancer.* 48:31-45. 2005
64. Poon R.T., Fan S. and Wong J. **Clinical Implications of Circulating Angiogenic Factors in Cancer Patients.** *Journal of Clinical Oncology.* 19:1207-1225. 2001
65. Folkman J. and Shing Y. **Angiogenesis.** *The Journal of Biological Chemistry.* 267(16):10931-10934. 1992
66. Skobe M., Hawighorst T., Jackson D.G., Prevo R., Janes L., Velasco P., Riccardi L., Alitalo K., Claffey K. and Detmar M. **Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis.** *Nature Medicine.* 7: 192-198. 2001
67. Mandriota S.J., Jussila L., Jeltsch M, Compagni A., Baetens D., Prevo R., Banerji S., Huarte J., Montesano R., Jackson D.G., Orci L., Alitalo K., Christofori G. and Pepper M.S. **Vascular endothelial growth factor-C mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis.** *The EMBO Journal.* 20(4): 672-682. 2001
68. Karpanen T., Egeblad M., Karkkainen M.J., Kubo H., Ylä-Herttua S., Jäättelä M. and Alitalo K. **Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth.** *Cancer Research.* 61: 1786-1790. 2001
69. Stacker S.A. Caesar C., Baldwin M.E., Thornton G.E., Williams R.A., Prevo R., Jackson D.G., Nishikawa S., Kubo H. and Achen M.G. **VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics.** *Nature Medicine.* 7:186-191. 2001

70. Witte M.H., Jones K., Wilting J., Dictor M., Selg M., McHale N., Gershenwald J.E. and Jackson D.G. **Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology.** *Cancer Metastasis Reviews.* 25:159-184. 2006
71. Stacker S.A., Baldwin M.E. and Achen M.G. **The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread.** *The FASEB Journal.* 16:922-934. 2002
72. Sandler A.B., Gray R., Brahmer J., Dowlati A., Schiller J.H., Perry M.C. and Johnson D.H. **Randomized phase II/III Trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab (NSC # 704865) in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): An Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Trial - E4599.** *Journal of Clinical Oncology.* 23(Suppl.1):16S. (Abstract n°4). 2005
73. Blumenschein G. and Heymach J.V. **Angiogenesis Inhibitors for Lung Cancer: Clinical Developments and Future Directions.** *Journal of Thoracic Oncology.* 1(7):744-748. 2006
74. Minami H., Ebi H., Tahara M., Sasaki Y., Yamamoto N., Yamada Y., Tamura T. and Saijo N. **A phase I study of an oral VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, ZD6474, in Japanese patients with solid tumors.** *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology.* 22:197. (Abstract n°778). 2003
75. Wedge S.R., Ogilvie D.J., Dukes M., Kendrew J., Chester R., Jackson J.A., Boffey S.J., Valentine P. J., Curwen J.O., Musgrove H.L., Graham G.A., Hughes G.D., Thomas A.P., Stokes E.S.E., Curry B., Richmond G.H.P., Wadsworth P.F., Bigley A.L. and Hennequin L.F. **ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis and tumor growth following oral administration.** *Cancer Research.* 62:4645-4655. 2002
76. Raymond E., Faivre S., Vera K., Delbaldo C., Robert C., Spatz A., Bello C., Brega N., Scigalla P. and Armand J.P. **Final results of a phase I and pharmacokinetic study of SU11248, a novel multi-target tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced cancers.** *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology.* 22:192 (Abstract n° 769). 2003
77. Eskens F.A.L.M. **Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going?** *British Journal of Cancer.* 90:1-7. 2004

78. Herbst R., Rugo H., Liu G. et al. **A phase I study of the VEGF/PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor AG-013736 in patients with advanced solid tumors: safety, pharmacokinetics, and dceMRI.** *Clinical Cancer Research*. 19(suppl.16):246 (Abstract n° C253). 2003
79. Ogilvie D.J, Kendrew J. and Barrie S.T. **AZD2171, a highly potent inhibitor of VEGF receptor signaling in primary human endothelial cells, exhibits broad-spectrum activity in tumor xenograft models.** *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology*. 45:1051 (Abstract n° 4553). 2004
80. Dupont J., Camastra D., Gordon M.S. et al. **Phase I study of VEGF Trap in patients with solid tumors and lymphoma.** *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology*. 22:194 (Abstract n° 776). 2003
81. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W.F., Cartwright T. Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R. and Kabbinavar F. **Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.** *The New England Journal of Medicine*. 350:2335-2342. 2004
82. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi A., Harvey V.S. and Dvorak H.F. **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.** *Science*. 219:983-985. 1983
83. Ferrara N. and Henzel W.J. **Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.** *Biochemical et Biophysical Research Communications*. 161:851-858. 1989
84. Connolly D.T., Olander J.V., Heuvelman D., Nelson R., Monsel R., Siegel N., Haymore B.L., Leimgruber R. and Feder J. **Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells.** *Journal of Biological Chemistry*. 264(33):20017-20024. 1989
85. Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Worren T., Feder J. and Connolly D.T. **Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.** *Science*. 246:1039-1312. 1989
86. Conn G., Bayne M.L., Soderman D.D., Kwok P.W., Sullivan K.A., Palisi T.M., Hope D.A. and Thomas K.A. **Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor.** *Proceedings of National Academy of Science*. 87:2628-2632. 1990

87. Muller Y.A., Christinger H.W., Keyt B.A. and Vos A.M. **The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding.** *Structure*. 5:1325-1338. 1997
88. Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K.S., Powell-Braxton L., Hillan K. J. and Moore M.W. **Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.** *Nature*. 380:439-442. 1996
89. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeys S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C, Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W. and Nagy A. **Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.** *Nature*. 380:435-439. 1996
90. Gerber H.P., Hillan K.J., Ryan A.M., Kowalski J., Keller G.A., Rangell L., Wright B.D., Radtke F., Aguet M. and Ferrara N. **VEGF is required for growth and survival in neonatal mice.** *Development*. 126:1149-1159. 1999
91. Eremina V., Sood M., Haigh J., Nagy A., Lajoie G., Ferrara N., Gerber H., Kikkawa Y., Miner J.H. and Quaggin S.E. **Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases.** *Journal of Clinical Investigation*. 111:707-716. 2003
92. Gerber H.P., Vu T.H., Ryan A.M., Kowalski J., Werb Z. and Ferrara N. **VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.** *Nature Medicine*. 5:623-628. 1999
93. Ryan A.M., Eppler D.B., Hagler K.E., Bruner R.H., Thomford P.J., Hall R.L., Shopp G.M, O'Neill C.A. **Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody.** *Toxicol Pathology*. 27:78-86. 1999
94. Ferrara N., Chen H., Davis-Smyth T., Gerber H., Nguyen T., Peers D., Chisholm V., Hillan K.J. and Schwall R.H. **Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis.** *Nature Medicine*. 4:336-340. 1998
95. Ferrara N., Gerber H.P. and LeCouter J. **The biology of VEGF and its receptors.** *Nature Medicine*. 9:669-676. 2003
96. Bates D.O., Hillman N.J., Williams B., Neal C.R. and Pockock T.M. **Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors.** *Journal of Anatomy*. 200:581-597. 2002

97. Leung D.W., Cachianes G., Kuang W., Goeddel D.V. and Ferrara N. **Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen.** *Science.* 246:1306-1309. 1989
98. Hood J.D., Meininger C.J., Ziche M. and Granger H.J. **VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells.** *American Journal of Physiology.* 274:H1054-1058. 1998
99. Kroll J. and Waltenberger J. **A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 265:636-699. 1999
100. Benjamin L.E. and Keshet E. **Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal.** *Proceedings of National Academy of Science.* 94:8761-8766. 1997
101. Gerber H.P., Dixit V and Ferrara N. **Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.** *Journal of Biological Chemistry.* 273:13313-13316. 1998
102. Storkebaum E., Lambrechts D. and Carmeliet P. **VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection.** *BioEssays.* 26:943-954. 2004
103. Pepper M.S., Ferrara N., Orci L. and Montesano R. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells.** *Biochemical et Biophysical Research Communications.* 181:902-906. 1991
104. Unemori E.N., Ferrara N., Bauer E.A. and Amento E.P. **Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells.** *Journal of Cell Physiology.* 153:557-562. 1992
105. Mandriota S.J., Seghezzi G., Vassalli J.D., Ferrara N., Wasi S., Mazzieri R., Mignatti P. and Pepper M.S. **Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells.** *Journal of Biological Chemistry.* 270:9709-9716. 1995
106. Vicenti V., Cassano C., Rocchi M. and Persico G. **Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3.** *Circulation.* 93:1493-1495. 1996

107. Houck K.A., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B. and Leung D. **The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.** *Molecular Endocrinology*. 5:1806-1814. 1991
108. Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J.C. and Abraham J.A. **The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple proteins forms are encoded through alternative exon splicing.** *Journal of Biological Chemistry*. 266:11947-11954. 1991
109. Poltorak Z., Cohen T., Sivan R., Kandelis Y., Spira G., Vlodavsky I., Keshet E. and Neufeld G. **VEGF<sub>145</sub>, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix.** *Journal of Biological Chemistry*. 272:7151-7158. 1997
110. Lei J., Jiang A. and Pei D. **Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF<sub>183</sub>.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1443:400-406. 1998
111. Cohen T., Gitay-Goren H., Sharon R., Shibuya M., Halaban R., Levi B.Z. and Neufeld G. **VEGF<sub>121</sub>, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells.** *Journal of Biological Chemistry*. 270(19):11322-11326. 1995
112. Houck K.A., Leung D., Rowland A.M., Winer J. and Ferrara N. **Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms.** *Journal of Biological Chemistry*. 267:26031-26037. 1992
113. Park J.E., Keller G.A. and Ferrara N. **The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF.** *Molecular Biology of the Cell*. 4:1317-1326. 1993
114. Plouet J., Moro F., Bertagnolli S., Coldeboeuf N., Mazarguil H., Clamens S. and Bayard F. **Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect.** *Journal of Biological Chemistry*. 272:13390-13396. 1997
115. Roy H., Bhardwaj S. and Ylä-Herttuala S. **Biology of vascular endothelial growth factors.** *FEBS Letters*. 580:2879-2887. 2006

116. Guo P., Xu L., Pan S., Brekken R.A., Yang S., Whitaker G.B., Nagane M., Thorpe P.E., Rosenbaum J.S., Huang H., Cavenee W.K. and Cheng S. **Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms Display Distinct Activities in Promoting Tumor Angiogenesis at Different Anatomic Sites.** *Cancer Research.* 61:8569-8577. 2001
117. Woolard J., Wang W., Bevan H.S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R.O., Cui T., Sugiono M., Waine E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J.D., Whittles C.E., Mushens R.E., Gillatt D.A., Ziche M., Harper S.J., and Bates D.O. **VEGF165b, an Inhibitory Vascular Endothelial Growth Factor Splice Variant: Mechanism of Action, *In vivo* Effect On Angiogenesis and Endogenous Protein Expression.** *Cancer Research.* 64: 7822-7835. 2004
118. Robinson C.J and Stringer S.E. **The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors.** *Journal of Cell Science.* 114(5):853-865. 2001
119. Shweiki D., Itin A., Soffer D. and Keshet E. **Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.** *Nature.* 359:843-845. 1992
120. Shima D.T., Deutsch U. and D'Amore P.A. **Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability.** *FEBS Letters.* 370:203-208. 1995
121. Dachs G.U. and Tozer G.M. **Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation.** *European Journal of Cancer.* 36:1649-1660. 2000
122. Pugh C.W. and Ratcliffe P.J. **Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system.** *Nature Medicine* 9:677-684. 2003
123. Levy A.P., Levy N.S. and Goldberg M.A. **Post-transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Hypoxia.** *The Journal of Biological Chemistry.* 271(5):2746-2753. 1996
124. Levy N.S., Chung S., Furneaux H. and Levy A.P. **Hypoxic Stabilization of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA by the RNA-binding Protein HuR.** *The Journal of Biological Chemistry.* 273(11):6417-6423. 1998

125. Yoo P.S., Mulkeen A.L and Cha C.H. **Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor: Implications for tumor angiogenesis.** *World Journal of Gastroenterology.* 12(31):4937-4942. 2006
126. McColl B.K., Stacker S.A. and Achen M.G. **Molecular regulation of the VEGF family inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis.** *APMIS.* 112:463-480. 2004
127. Pagés G. and Pouysségur J. **Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene a concert of activating factors.** *Cardiovascular Research.* 65:564-573. 2005
128. Tammela T., Enholm B., Alitalo K. and Paavonen K. **The biology of vascular endothelial growth factors.** *Cardiovascular Research.* 65:550-563. 2005
129. Salven P., Lymboussaki A., Heikkilä P., Jääskela-Saari H., Enholm B., Aase K., von Euler G., Eriksson U., Alitalo K. and Joensuu H. **Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors.** *American Journal of Pathology.* 153:103-108. 1998
130. Chilov D., Kukk E., Taira S., Jeltsch M.M., Kaukonen J., Palotie A., Joukov V. and Alitalo K. **Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C.** *Journal of Biological Chemistry.* 272:25176-25183. 1997
131. Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Cao Y., Saksela O., Kalkkinen N. and Alitalo K. **Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C.** *The EMBO Journal.* 16(13):3898-3911. 1997
132. Orlandini M., Marconcini L., Ferruzzi R. and Oliviero S. **Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family.** *Proceedings of National Academy of Science.* 93:11675-11680. 1996
133. Achen M.G., Jeltsch M., Kukk E., Mäkinen T., Vitali A., Wilks A.F., Alitalo K. and Stacker S. **Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4).** *Proceedings of National Academy of Science.* 95:548-553. 1998



134. Marconcini L., Marchio S., Morbidelli L., Cartocci E., Albini A., Ziche M., Bussolino F. and Oliviero S. **c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis *in vivo* and *in vitro***. *Proceedings of National Academy of Science*. 96:9671-9676. 1999
135. Yamazaki Y., Takani K., Atoda H., and Morita T. **Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) Exhibit Potent Activity through Their Specific Recognition of KDR (VEGF Receptor 2)**. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(52):51985-51988. 2003
136. Tokunaga Y., Yamazaki Y and Morita T. **Specific distribution of VEGF-F in Viperinae snake venoms: Isolation and characterization of a VEGF-F from the venom of *Daboia russelli siamensis***. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 439:241-247. 2005
137. Suto K., Yamazaki Y., Morita T. and Mizuno H. **Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms**. *Journal of Biological Chemistry*. 280:2126-2131. 2005
138. Yamazaki Y., Tokunaga Y., Takani K. and Morita T. **Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A<sub>165</sub>**. *Biochemistry*. 44:8858-8864. 2005
139. Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoullis S., Bramley A.H., Vincent L., Costa C., MacDonald D.D., Jin D.K., Shido K., Kerns S.A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J.L., Altorki N., Port E.R., Ruggero D., Shmelkov S.V., Jensen K.K., Rafii S. and Lyden D. **VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche**. *Nature*. 438:820-827. 2005
140. Barleon B., Sozzani S., Zhou D., Weich H.A., Mantovani A. and Marme D. **Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1**. *Blood*. 87:3336-3343. 1996
141. Lyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chadburn A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y., Hicklin D., Zhu Z., Hackett N.R., Crystal R.G., Moore M.A., Hajar K.A., Manova K., Benezra R. and Rafii S. **Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumour angiogenesis and growth**. *Nature Medicine*. 7:1194-1201. 2001

142. Baldwin M.E., Stacker S.A. and Achen M.G. **Molecular control of lymphangiogenesis.** *BioEssays.* 24:1030-1040. 2002
143. Shibuya M. and Claesson-Welsh L. **Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.** *Experimental Cell Research.* 312:549-560. 2006
144. Sawano A., Takahashi T., Yamaguchi S. and Shibuya M. **The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma.** *Biochemical et Biophysical Research Communications.* 238:487-491. 1997
145. Landgren E., Schiller P., Cao Y. and Claesson-Welsh L. **Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1.** *Oncogene* 16:359-367. 1998
146. Garces C.A., Kurenova E.V., Golubovskaya V.M and Cance W.G. **Vascular Endothelial Growth Factor receptor-3 and Focal Adhesion Kinase Bind and suppress Apoptosis in Breast Cancer Cells.** *Cancer Research.* 66(3):1446-1454. 2006
147. Holmgren L., O'Reilly M.S. and Folkman J. **Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.** *Nature Medicine.* 1:149-153. 1995
148. Folkman J. **Clinical applications of research on angiogenesis.** *The New England Journal of Medicine.* 333:1757-1763.1995
149. Xia G., Kumar S.R., Hawes D., Cai J., Hassanieh L., Groshen S., Zhu S., Masood R., Quinn D.I., Broek D., Stein J.P. and Gill P.S. **Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer.** *Journal of Urology.* 175(4):1245-1252. 2006
150. Talvensaaari-Mattila A., Soini Y. and Santala M. **VEGF and its receptors (flt-1 and KDR/flk-1) as prognostic indicators in endometrial carcinoma.** *Tumour Biology.* 26(2):81-87. 2005
151. Kyzas P.A., Stefanou D., Batistatou A. and Agnantis N.J. **Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma.** *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology.* 131(9):624-630. 2005

152. Kyzas P.A., Cunha I.W. and Ioannidis J.P. **Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis.** *Clinical Cancer Research.* 11(4):1434-1440. 2005
153. Onesto C., Hannoun-Levi J.M., Chamorey E., Formento J.L., Ramaioli A. and Pages G. **Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance.** *British Journal of Cancer.* 94(10):1516-1523. 2006
154. Raspollini M.R., Amunni G., Villanucci A., Baroni G., Boddi V. and Taddei G.L. **Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma.** *International Journal of Gynecological Cancer.* 14(5):815-823. 2004
155. Rudlowski C., Pickart A.K., Fuhljohn C., Friepoertner T., Schlehe B., Biesterfeld S. and Schroeder W. **Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer patients: a long-term follow-up.** *International Journal of Gynecological Cancer.* 16(Suppl 1):183-189. 2006
156. Zhi Y.H., Liu R.S., Song M.M., Tian Y., Long J., Tu W. and Guo R.X. **Cyclooxygenase-2 promotes angiogenesis by increasing vascular endothelial growth factor and predicts prognosis in gallbladder carcinoma.** *World Journal of Gastroenterology.* 11(24):3724-3728. 2005
157. Cui J., Dong B.W., Liang P., Yu X.L. and Yu D.J. **Construction and clinical significance of a predictive system for prognosis of hepatocellular carcinoma.** *World Journal of Gastroenterology.* 11(20):3027-3033. 2005
158. Yao D.F., Wu X.H., Zhu Y., Shi G.S., Dong Z.Z., Yao D.B., Wu W., Qiu L.W. and Meng X.Y. **Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma.** *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 4(2):220-226. 2005
159. Desruisseau S., Palmari J., Giusti C., Romain S., Martin P.M. and Berthois Y. **Clinical relevance of amphiregulin and VEGF in primary breast cancers.** *International Journal of Cancer.* 111(5):733-740. 2004

160. Konecny G.E., Meng Y.G., Untch M., Wang H.J., Bauerfeind I, Epstein M., Stieber P., Vernes J.M., Gutierrez J., Hong K., Beryt M., Hepp H., Slamon D.J. and Pegram M.D. **Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients.** *Clinical Cancer Research*. 10(5):1706-1716. 2004
161. Nam D.H., Park K., Suh Y.L. and Kim J.H. **Expression of VEGF and brain specific angiogenesis inhibitor-1 in glioblastoma: prognostic significance.** *Oncology Reports*. 11(4):863-869. 2004
162. Yang C.C., Chu K.C. and Yeh W.M. **Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma is correlated with cancer advancement.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 17(3):85-89. 2003
163. Yang C.C., Chu K.C. and Yeh W.M. **The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression.** *Urologic Oncology*. 22(1):1-6. 2004
164. Ogata Y., Fujita H., Yamana H., Sueyoshi S. and Shirouzu K. **Expression of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor innode-positive squamous cell carcinoma in the thoracic esophagus: long-term follow-up study.** *World Journal of Surgery*. 27(5):584-589. 2003
165. Takahashi R., Tanaka S., Kitadai Y., Sumii M., Yoshihara M., Haruma K. and Chayama K. **Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach.** *Oncology*. 64(3):266-274. 2003
166. Duff S.E., Li C., Jeziorska M., Kumar S., Saunders M.P., Sherlock D., O'Dwyer S.T. and Jayson G.C. **Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy.** *British Journal of Cancer*. 89:426-430. 2003
167. Juttner S., Wissmann C., Jons T., Vieth M., Hertel J., Gretschel S., Schlag P.M., Kemmner W. and Hocker M. **Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma.** *Journal of Clinical Oncology*. 24(2):228-240. 2006
168. Shida A., Fujioka S., Kobayashi K., Ishibashi Y., Nimura H., Mitsumori N. and Yanaga K. **Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma.** *International Journal of Clinical Oncology*. 11(1):38-43. 2006

169. Akagi K., Ikeda Y., Miyazaki M., Abe T. and Kinoshita J., Maehara Y. and Sugimachi K. **Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues.** *British Journal of Cancer.* 83:887-891. 2000
170. Furudoi A., Tanaka S., Haruma K., Kitadai Y., Yoshihara M., Chayama K. and Shimamoto F. **Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma.** *Oncology.* 62(2):157-166. 2002
171. White J.D., Hewett P.W., Kosuge D., McCulloch T., Enholm B.C., Carmichael J. and Murray J.C. **Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma.** *Cancer Research.* 62(6):1669-1675. 2002
172. Funaki H., Nishimura G., Harada S., Ninomiya I., Terada I., Fushida S., Tani T., Fujimura T., Kayahara M., Shimizu K., Ohta T. and Miwa K. **Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma.** *Oncology.* 64(4):416-422. 2003
173. Kazama S., Kitayama J., Watanabe T. and Nagawa H. **Expression pattern of vascular endothelial growth factor-C in human colorectal normal mucosa and neoplastic mucosa.** *Hepatology.* 51(56):391-395. 2004
174. Onogawa S., Kitadai Y., Tanaka S., Kuwai T., Kimura S. and Chayama K. **Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma.** *Cancer Science.* 95(1):32-39. 2004
175. Byeon J.S., Jung H.Y., Lee Y.J., Lee D, Lee G.H., Myung S.J., Yang S.K., Hong W.S., Kim J.H., Min Y.I. and Kim J.S. **Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C and cyclooxygenase-2 in esophageal squamous cell carcinoma.** *Journal of Gastroenterology & Hepatology.* 19(6):648-654. 2004
176. Nakashima T., Kondoh S., Kitoh H., Ozawa H., Okita S., Harada T., Shiraishi K., Ryozaawa S. and Okita K. **Vascular endothelial growth factor-C expression in human gallbladder cancer and its relationship to lymph node metastasis.** *International Journal of Molecular Medicine.* 11(1):33-39. 2003

177. Kinoshita J., Kitamura K., Kabashima A., Saeki H., Tanaka S. and Sugimachi K. **Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment.* 66(2):159-164. 2001
178. Nakamura Y., Yasuoka H, Tsujimoto M., Yang Q., Imabun S., Nakahara M., Nakao K., Nakamura M., Mori I. and Kakudo K. **Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor D in Breast Carcinoma with Long-Term Follow-Up.** *Clinical Cancer Research.* 9:716-721. 2003
179. Nakamura Y., Yasuoka H., Tsujimoto M., Yang Q., Imabun S., Nakahara M., Nakao K., Nakamura M., Mori I. and Kakudo K. **Flt-4-positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-d expression, nodal status, and prognosis in breast cancer.** *Clinical Cancer Research.* 9(14):5313-5317. 2003
180. Yokoyama Y., Charnock-Jones D.S., Licence D., Yanaihara A., Hastings J.M., Holland C.M., Emoto M., Umemoto M., Sakamoto T., Sato S., Mizunuma H. and Smith S.K. **Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma.** *British Journal of Cancer.* 88:237-244. 2003
181. Mattern J., Koomagi R. and Volm M. **Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma.** *British Journal of Cancer.* 73:931-934. 1996
182. Volm M., Koomagi R. and Mattern J. **Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer.** *International Journal of Cancer.* 74:64-68. 1997
183. Mattern J., Koomagi R. and Volm M. **Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density.** *Anticancer Research.* 17:2249-2252. 1997
184. Ohta Y., Endo Y., Tanaka M., Shimizu J., Oda M., Hayashi Y., Watanabe Y. and Sasaki T. **Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer.** *Clinical Cancer Research.* 2:1411-1416. 1996

185. Fontanini G., Vignati S., Boldrini L., Chine S., Silvestri V., Lucchi M., Mussi A., Angeletti C.A. and Bevilacqua G. **Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma.** *Clinical Cancer Research.*3:861-865. 1997
186. Tsao M.S., Liu N., Nicklee T., Shepherd F and Viallet J. **Angiogenesis correlates with vascular endothelial growth factor expression but not with K-ras oncogene activation in non-small cell lung carcinoma.** *Clinical Cancer Research.* 3:1807-1814. 1997
187. Giatromanolaki A., Koukourakis M.I., Kakolyris S., Turley H., O'Byrne K., Scott P.A., Pezzella F., Georgoulas V., Harris A.L. and Gatter K.C. **Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer.** *Clinical Cancer Research.* 4:3017-3024. 1998
188. Fontanini G., Boldrini L., Vignati S., Chiné S., Basolo F., Silvestri V., Lucchi M., Mussi A., Angeletti C.A. and Bevilacqua G. **bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma.** *The European Journal of Cancer.* 34:718-723. 1998
189. Imoto H., Osaki T., Taga S., Ohgami A., Ichiyoshi Y. and Yasumoto K. **Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: prognostic significance in squamous cell carcinoma.** *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery.*115:1007-1014. 1998
190. Shibusa T., Shijubo N. and Abe S. **Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma.** *Clinical Cancer Research.* 4:1483-1487. 1998
191. Oshika Y., Nakamura M., Tokunaga T., Ozeki Y., Fukushima Y., Hatanaka H., Abe Y., Yamazaki H., Kijima H., Tamaoki N. and Ueyama Y. **Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer.** *International Journal of Oncology.*12:541-544. 1998
192. Decaussin M., Sartelet H., Robert C., Moro D., Claraz C., Brambilla C., Brambilla E. **Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival.** *Journal of Pathology.*188:369-377. 1999

193. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Thorpe P.E., Brekken R.A., Sivridis E., Kakolyris S., Georgoulas V., Gatter K.C. and Harris A.L. **Vascular endothelial growth factor/KDR activated microvessel density versus CD31 standard microvessel density in non small cell lung cancer.** *Cancer Research.* 60:3088-3095. 2000
194. O'Byrne K.J., Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Cox G., Turley H., Steward W.P., Gatter K. and Harris A.L. **Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial growth factor, and angiogenesis in non-small cell lung cancer.** *British Journal of Cancer.* 82:1427-1432. 2000
195. Ohta Y., Nozawa H., Tanaka Y., Oda M. and Watanabe Y. **Increased Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor-C and Decreased NM23 Expression Associated with Microdissemination in the Lymph Nodes in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer.** *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 119:804-813. 2000
196. Yuan A., Yu C.J., Chen W.J., Lin F.Y., Kuo S.H., Luh K.T. and Yang P.C. **Correlation of Total VEGF mRNA and Protein Expression With Histologic Type, Tumor Angiogenesis, Patient Survival and Timing of Relapse in Non-Small-Cell Lung Cancer.** *International Journal of Cancer.* 89:475-483. 2000
197. Yuan A., Yu C.J., Kuo S.H., Chen W.J., Lin F.Y., Luh K.T., Yang P.C. and Lee Y.C. **Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer.** *Journal of Clinical Oncology.* 19:432-441. 2001
198. Niklinska W., Burzykowski T., Chyczewski L. and Niklinski J. **Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in non small cell lung cancer (NSCLC): association with p53 gene mutation and prognosis.** *Lung Cancer.* 34(Suppl.2):S59-S64. 2001
199. Han H., Silverman J.F., Santucci T.S., Macherey R.S., dAmato T.A., Tung M.Y., Weyant R.J. and Landreneau R.J. **Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis.** *Annals of Surgical Oncology.* 8:72-79. 2001



200. Offersen B.V., Pfeiffer P., Hamilton-Dutoit S. and Overgaard J. **Patterns of Angiogenesis in Nonsmall-Cell Lung Carcinoma.** *Cancer.* 91:1500-1509. 2001
201. Masuya D., Huang C., Liu D., Kameyama K., Hayashi E., Yamauchi A., Kobayashi S., Haba R. and Yokomise H. **The Intratumoral Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-8 Associated with Angiogenesis in Nonsmall Cell Lung Carcinoma Patients.** *Cancer.* 92:2628-2638. 2001
202. Yuan A., Yu C.J., Luh K.T., Kuo S., Lee Y. and Yang P. **Aberrant p53 expression correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in non-small-cell lung cancer.** *Journal of Clinical Oncology.* 20:900-910. 2002
203. Inoshima N., Nakanishi Y., Minami T., Izumi M., Takayama K., Yoshino I. and Hara N. **The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer.** *Clinical Cancer Research.* 8:3480-3486. 2002
204. Fontanini G., Faviana P., Lucchi M., Boldrini L., Mussi A., Camacci T., Mariani M.A., Angeletti C.A., Basolo F., Pingitore R. **A high vascular count and overexpression of vascular endothelial growth factor are associated with unfavourable prognosis in operated small cell carcinoma.** *British Journal of Cancer.* 86:558-563. 2002.
205. Nakashima T., Huang C.L., Liu D., Kameyama K., Masuya D., Ueno M., Haba R. and Yokomise H. **Expression of vascular endothelial growth factor-A and vascular endothelial growth factor-C as prognostic factors for non-small cell lung cancer.** *Medical Science Monitor.* 10:BR157-165. 2004
206. Mineo T.C., Ambrogi V., Baldi A., Rabitti C., Bollero P., Vicenzi B. and Tonini G. **Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer.** *Journal of Clinical Pathology.* 57:591-597. 2004
207. Seto T., Higashiyama M., Funai H., Imamura F., Uematsu K., Seki N., Eguchi K., Yamanaka T. and Ichinose Y. **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.* 53(1):91-96. 2006

208. Yano T., Tanikawa S., Fujie T., Masutani M. and Horie T. **Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer.** *European Journal of Cancer.* 36:601-609. 2000
209. Toomey D., Smyth G., Condrón C., Kay E., Conroy R., Foley D., Hong C., Hogan C., Toner S., McCormick P., Broe P., Kelly C. and Bouchier-Hayes D. **Immune Function, Telomerase, and Angiogenesis in Patients with Primary, Operable Nonsmall Cell Lung Carcinoma.** *Cancer.* 92:2648-2657. 2001
210. Liao M., Wang H., Lin Z., Feng J. and Zhu D. **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. 2001
211. Baillie R., Carlile J., Pendleton N. and Schor A.M. **Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer.** *Journal of Clinical Pathology.* 54:116-120. 2001
212. Dowell J.E., Amirkhan R.H., Lai W.S., Frawley W.H. and Minna J.D. **Survival in small cell lung cancer is independent of tumor expression of VEGF and COX-2.** *Anticancer Research.* 24(4):2367-2373. 2004
213. Ludovini V., Gregorc V., Pistola L., Mihaylova Z., Floriani I., Darwish S., Stracci F., Tofanetti F.R., Ferraldeschi M., Di Carlo L., Ragusa M., Daddi G. and Tonato M. **Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer.** *Lung Cancer.* 46:77-85. 2004.
214. Kim S.J., Rabbani Z.N., Dewhirst M.W., Vujaskovic Z., Vollmer R.T., Schreiber E.G., Oosterwijk E. and Kelley M.J. **Expression of HIF-1 $\alpha$ , CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer.** *Lung Cancer.* 49:325-335. 2005
215. Delmotte P., Martin B., Paesmans M., Berghmans T., Mascaux C., Meert A.P., Steels E., Verdebout J.M., Lafitte J.J., Sculier J.P. **VEGF and survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta-analysis.** *Revue des Maladies Respiratoires.* 19:577-584. 2002
216. Kajita T., Ohta Y., Kimura K., Tamura M., Tanaka Y., Tsunozuka Y., Oda M., Sasaki T. and Watanabe G. **The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer.** *British Journal of Cancer.* 85:255-260. 2001

217. Arinaga M., Noguchi T., Takeno S., Chujo M., Miura T., Uchida Y. **Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma.** *Cancer.* 97(2):457-464. 2003
218. Ogawa E., Takenaka K., Yanagihara K., Kurozumi M., Manabe T., Wada H. and Tanaka F. **Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients.** *British Journal of Cancer.* 91(3):498-503. 2004
219. Kojima H., Shijubo N., Yamada G., Ichimiya S., Abe S., Satoh M. and Sato N. **Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with T1 lung adenocarcinoma.** *Cancer.* 104(8):1668-1677. 2005
220. Chen F., Takenaka K., Ogawa E., Yanagihara K., Otake Y., Wada H. and Tanaka F. **Flt-4-positive endothelial cell density and its clinical significance in non-small cell lung cancer.** *Clinical Cancer Research.* 10(24):8548-8553. 2004
221. Kato H., Yoshikawa M., Miyazaki T., Nakajima M., Fukai Y., Masuda N., Fukuchi M., Manda R., Tsukada K. and Kuwano H. **Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) in esophageal squamous cell carcinoma.** *Anticancer Research.* 22(6C):3977-3984. 2002
222. Dales J.P., Garcia S., Carpentier S., Andrac L., Ramuz O., Lavaut M.N., Allasia C., Bonnier P. and Taranger-Charpin C. **Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer (n=905).** *British Journal of Cancer.* 90(6):1216-1221. 2004
223. Meunier-Carpentier S., Dales J.P., Djemli A., Garcia S., Bonnier P., Andrac-Meyer L., Lavaut M.N., Allasia C. and Charpin C. **Comparison of the prognosis indication of VEGFR-1 and VEGFR-2 and Tie2 receptor expression in breast carcinoma.** *International Journal of Oncology.* 26(4):977-984. 2005
224. Zhukova L.G., Zhukov N.V. and Lichinitser M.R. **Expression of Flt-1 and Flk-1 receptors for vascular endothelial growth factor on tumor cells as a new prognostic criterion for locally advanced breast cancer.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 135(5):478-481. 2003

225. Hormbrey E., Gillespie P., Turner K, Han C., Roberts A., McGrouther D. and Harris A.L. **A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful?** *Clinical and Experimental Metastasis*. 19:651-663. 2002
226. Jelkmann W. **Pitfalls in the Measurement of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor.** *Clinical Chemistry*. 47(4):617-623. 2001
227. Matsuyama W., Hashiguchi T., Mizoguchi A., Iwami F., Kawabata M., Arimura K. and Osame M. **Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer.** *Chest*. 118:948-951. 2000
228. Tamura M., Ohta Y., Kajita T., Kimura K., Go T., Oda M., Nakamura H. and Watanabe G. **Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in nonsmall cell lung cancer.** *Oncology Reports*. 8:1097-1102. 2001
229. Mall J.W., Schwenk W., Philipp A.W., Meyer-Kipker C., Mall W., Muller J. and Pollmann C. **Serum vascular endothelial growth factor levels correlate better with tumour stage in small cell lung cancer than albumin, neuron-specific enolase or lactate dehydrogenase.** *Respirology*. 7(2):99-102. 2002
230. Tamura M. and Ohta Y. **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. 2003
231. Tamura M., Oda M., Matsumoto I., Tsunozuka Y., Kawakami K., Ohta Y. and Watanabe G. **The combination assay with circulating vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, matrix metalloproteinase-9, and VEGF for diagnosing lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer.** *Annals of Surgery Oncology*. 11:928-933. 2004
232. Brattstrom D., Bergqvist M., Hesselius P., Larsson A., Lamberg K., Wernlund J., Brodin O. and Wagenius G. **Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate larger primary tumours and poorer survival in nonsmall cell lung cancer patients.** *Lung Cancer*. 37:57-63. 2002
233. Laack E., Kohler A., Kugler C., Dierlamm T., Knuffmann C., Vohwinkel G., Niestroy A., Dahlmann N., Peters A., Berger J., Fiedler W. and Hossfeld D.K. **Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer.** *Annals of Oncology*. 13:1550-1557. 2002

234. Trape J., Buxo J. and de Olaguer J.P. **Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in advanced non-small cell lung cancer.** *Clinical Chemistry.* 49:523-525. 2003
235. Brattstrom D., Bergqvist M., Hesselius P., Larsson A., Wagenius G. and Brodin O. **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. 2004
236. Kaya A., Ciledag A., Gulbay B.E., Poyraz B.M., Celik G., Sen E., Savas H. and Savas I. **The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients.** *Respiratory Medicine.* 98:632-636. 2004
237. Dudek A.Z. and Mahaseth H. **Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival.** *Cancer Investigation.* 23(3):193-200. 2005
238. Shimanuki Y., Takahashi K., Cui R., Hori S., Takahashi F., Miyamoto H., Fukurchi Y. **Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer.** *Lung.* 183(1):29-42. 2005
239. Hasegawa Y., Takanashi S., Okudera K., Kumagai M., Hayashi A., Morimoto T. and Okumura K. **Vascular endothelial growth factor level as a prognostic determinant of small cell lung cancer in Japanese patients.** *Internal Medicine.* 44(1):26-34. 2005
240. Brattstrom D., Bergqvist M., Larsson A., Holmertz J., Hesselius P., Rosenberg L., Brodin O. And Wagenius G. **Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera from non-small cell lung cancer patients.** *Anticancer Research.* 18:1123-1127. 1998
241. Takigawa N., Segawa Y., Fujimoto N., Hotta K. and Eguchi K. **Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer.** *Anticancer Research.* 18:1251-1254. 1998

242. Choi J.H., Kim H.C., Lim H.Y., Nam D.K., Kim H.S., Yi J.W., Chun M., Oh Y.T., Kang S., Park K.J., Hwang S.C., Lee Y.H and Hahn M.H. **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. 2001
243. Suzuki M., Iizasa T., Ko E., Baba M., Saitoh Y., Shibuya K., Sekine Y., Yoshida S., Hiroshima K. and Fujisawa T. **Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer.** *Lung Cancer.* 35:29-34. 2002
244. Tas F., Duranyildiz D., Oguz H., Camlica H., Yasasever V. and Topuz E. **Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) levels in small cell lung cancer.** *Cancer Investigation.* 24(5):492-496. 2006
245. Tas F., Duranyildiz D., Oguz H., Camlica H., Yasasever V. and Topuz E. **Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and bcl-2 levels in advanced stage non-small cell lung cancer.** *Cancer Investigation.* 24(6):576-580. 2006
246. Ilhan N., Ilhan N. and Deveci F. **Functional significance of vascular endothelial growth factor and its receptor (receptor-1) in various lung cancer types.** *Clinical Biochemistry.* 37:840-845. 2004
247. Tamura M., Oda M., Tsunozuka Y., Matsumoto I., Kawakami K., Ohta Y. and Watanabe G. **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. 2004
248. Izquierdo M. **Derrames pleurales malignos: Carcinomas.** *Monografías NEUMOMADRID: Enfermedades de la pleura.* Vol. V:95-104. 2003
249. Grove C.S. and Lee C.G. **Vascular endothelial growth factor: the key mediator in pleural effusion formation.** *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 8:294-301. 2002
250. Maniwa Y., Okada M., Ishii N., and Kiyooka K. **Vascular Endothelial Growth Factor Increased by Pulmonary Surgery Accelerates the Growth of Micrometastases in Metastatic Lung Cancer.** *Chest.* 114:1668-1675. 1998
251. Ohta Y., Tomita Y., Oda M., Watanabe S., Murakami S. and Watanabe Y. **Tumor angiogenesis and recurrence in stage I non-small cell lung cancer.** *Annals of Thoracic Surgery.* 68(3):1034-1038. 1999

252. White E.S., Flaherty K.R., Carskadon S., Brant A., Iannettoni M.D., Yee J., Orringer M.B. and Arenberg D.A. **Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis.** *Clinical Cancer Research.* 9(2):853-860. 2003
253. Salven P., Routsalainen T., Mattson K. and Joensuu H. **High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer.** *International Journal of Cancer.* 17:144-146. 1998
254. Bremnes M.R., Camps C. and 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.* 51:143-158. 2006
255. Folkman J. **Role of Angiogenesis in Tumor Growth and Metastasis.** *Seminars in Oncology.* 29(6):15-18. 2002
256. de Castro G., Puglisi F., Azambuja E., El Saghir N.S. and Awada A. **Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the “do ut des” paradigm).** *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 59:40-50. 2006
257. Kerbel R.S. **Antiangiogenic Therapy: A Universal Chemosensitization Strategy for Cancer?** *Science.* 312:1171-1174. 2006
258. Arber W. and Linn S. **DNA modification and restriction.** *Annual Review of Biochemistry.* 38:467-500. 1969
259. Smith H.O. and Wilcox K.W. **A restriction enzyme from Hemophilus influenzae: I. Purification and general properties.** *Journal of Molecular Biology.* 51:379-391. 1970
260. Danna K. and Nathans D. **Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae.** *Proceedings of National Academy of Science.* 68:2913-2917. 1971
261. Baltimore D. **RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.** *Nature.* 226:1209-1211. 1970
262. Temin H.M. and Mizutani S. **RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.** *Nature.* 226:1211-1213. 1970
263. Southern E.M. **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *Journal of Molecular Biology.* 98:503-517. 1975

264. Thomas P.S. **Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.** *Proceedings of National Academy of Science.* 77:5201-5205. 1980
265. Kafatos F.C., Jones C.W. and Efstratiadis A. **Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure.** *Nucleic Acids Research.* 7:1541-1552. 1979
266. Maxam A.M. and Gilbert W. **A new method for sequencing DNA.** *Proceedings of National Academy of Science.* 74:560-564. 1977
267. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. **DNA sequencing with chainterminating inhibitors.** *Proceedings of National Academy of Science.* 74:5463-5467. 1977
268. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G. and Erlich H. **Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science.* 230:1350-1354. 1985
269. Mullis K.B. and Faloona F.A. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** *Methods in Enzymology.* 155:335-350. 1987
270. International Human Genome Sequencing Consortium. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature.* 409:860-921. 2001
271. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al. **The sequence of the human genome.** *Science.* 291:1304-1351. 2001
272. International Human Genome Sequencing Consortium. **Finishing the euchromatic sequence of the human genome.** *Nature.* 431:931-945. 2004
273. Fodor S.P., Rava R.P., Huang X.C., Pease A.C., Holmes C.P. and Adams C.L. **Multiplexed biochemical assays with biological chips.** *Nature.* 364(6437):555-556. 1993
274. Schena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P.O. **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** *Science.* 270(5235):467-470. 1995
275. Csako G. **Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing.** *Clinica Chimica Acta.* 363:6-31. 2006
276. Kiechle F.L and Zhang X. **The Postgenomic Era: Implications for the Clinical Laboratory.** *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 126:255-262. 2002



277. Heller M.J. **DNA microarray technology: devices, systems, and applications.** *Annual Review of Biomedical Engineering.* 4:129-153. 2002
278. Luo J., Duggan D.J., Chen Y., Sauvageot J., Ewing C.M., Bittner M.L., Trent J.M. and Isaacs W.B. **Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling.** *Cancer Research.* 61(12):4683-4688. 2001
279. Shridhar V., Lee J., Pandita A., Iturria S., Avula R., Staub J., Morrissey M., Calhoun E., Sen A., Kalli K., Keeney G., Roche P., Cliby W., Lu K., Schmandt R., Mills G.B., Bast R.C. Jr., James C.D., Couch F.J., Hartmann L.C., Lillie J. and Smith D.I. **Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors.** *Cancer Research.* 61(15):5895-5904. 2001
280. Li Y., St John M.A., Zhou X., Kim Y., Sinha U., Jordan R.C., Eisele D., Abemayor E., Elashoff D., Park N.H. and Wong D.T. **Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection.** *Clinical Cancer Research.* 10(24):8442-8450. 2004
281. Sharma P., Sahni N.S., Tibshirani R., Skaane P., Urdal P., Berghagen H., Jensen M., Kristiansen L., Moen C., Sharma P., Zaka A., Arnes J., Sauer T., Akslen L.A., Schlichting E., Borresen-Dale A.L. and Lonneborg A. **Early detection of breast cancer based on gene-expression patterns in peripheral blood cells.** *Breast Cancer Research.* 7(5):R634-644. 2005
282. Joshi N., Johnson L.L., Wei W.Q., Abnet C.C., Dong Z.W., Taylor P.R., Limburg P.J., Dawsey S.M., Hawk E.T., Qiao Y.L., Kirsch I.R. **Gene expression differences in normal esophageal mucosa associated with regression and progression of mild and moderate squamous dysplasia in a high-risk Chinese population.** *Cancer Research.* 66(13):6851-6860. 2006
283. Bianchini M., Levy E., Zucchini C., Pinski V., Macagno C., De Sanctis P., Valvassori L., Carinci P. and Mordoh J. **Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa.** *International Journal of Oncology.* 29(1):83-94. 2006
284. Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., Loh M.L., Downing J.R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D. and Lander E.S. **Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring.** *Science.* 286(5439):531-532. 1999

285. Bittner M., Meltzer P., Chen Y., Jiang Y., Seftor E., Hendrix M., Radmacher M., Simon R., Yakhini Z., Ben-Dor A., Sampas N., Dougherty E., Wang E., Marincola F., Gooden C., Lueders J., Glatfelter A., Pollock P., Carpten J., Gillanders E., Leja D., Dietrich K., Beaudry C., Berens M., Alberts D. and Sondak V. **Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling.** *Nature*. 406(6795):536-540. 2000
286. van't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M., Peterse H.L., van der Kooy K., Marton M.J., Witteveen A.T., Schreiber G.J., Kerkhoven R.M., Roberts C., Linsley P.S., Bernards R. and Friend S.H. **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature*. 415(6871):530-536. 2002
287. Roepman P., Wessels L.F., Kettelarij N., Kemmeren P., Miles A.J., Lijnzaad P., Tilanus M.G., Koole R., Hordijk G.J., van der Vliet P.C., Reinders M.J., Slootweg P.J. and Holstege F.C. **An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas.** *Nature Genetics*. 37(2):182-186. 2005
288. Bertucci F., Finetti P., Cervera N., Charafe-Jauffret E., Mamessier E., Adelaide J., Debono S., Houvenaeghel G., Maraninchi D., Viens P., Charpin C., Jacquemier J. and Birnbaum D. **Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers.** *Cancer Research*. 66(9):4636-4644. 2006
289. Smid M., Wang Y., Klijn J.G., Sieuwerts A.M., Zhang Y., Atkins D., Martens J.W., Foekens J.A. **Genes associated with breast cancer metastatic to bone.** *Journal of Clinical Oncology*. 24(15):2261-2267. 2006
290. Heinzelmann-Schwarz V.A., Gardiner-Garden M., Henshall S.M., Scurry J.P., Scolyer R.A., Smith A.N., Bali A., Vanden Bergh P., Baron-Hay S., Scott C., Fink D., Hacker N.F., Sutherland R.L. and O'Brien P.M. **A distinct molecular profile associated with mucinous epithelial ovarian cancer.** *British Journal of Cancer*. 94(6):904-913. 2006
291. Zanders E.D. **Gene expression analysis as an aid to the identification of drug targets.** *Pharmacogenomics*. 1(4):375-384. 2000

292. Troester M.A., Hoadley K.A., Sorlie T., Herbert B.S., Borresen-Dale A.L., Lonning P.E., Shay J.W., Kaufmann W.K. and Perou C.M. **Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer.** *Cancer Research.* 64(12):4218-4226. 2004
293. Ross J.S., Symmans W.F., Pusztai L. and Hortobagyi G.N. **Pharmacogenomics and clinical biomarkers in drug discovery and development.** *American Journal of Clinical Pathology.* 124 Suppl:S29-41. 2005
294. Boyer J., Allen W.L., McLean E.G., Wilson P.M., McCulla A., Moore S., Longley D.B., Caldas C. and Johnston P.G. **Pharmacogenomic identification of novel determinants of response to chemotherapy in colon cancer.** *Cancer Research.* 66(5):2765-2777. 2006
295. Anbazhagan R., Tihan T., Bornman D.M., Johnston J.C., Saltz J.H., Weigering A., Piantadosi S. and Gabrielson E. **Classification of Small Cell Lung Cancer and Pulmonary Carcinoid by Gene Expression Profiles.** *Cancer Research.* 59:5119-5122. 1999
296. Wang T., Hopkins D., Schmidt C., Silva S., Houghton R., Takita H., Repasky E. and Reed S.G. **Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis.** *Oncogene.* 19:1519-1528. 2000
297. Bhattacharjee A., Richards W.G., Staunton J., Li C., Monti S., Vasa P., Ladd C., Beheshti J., Bueno R., Gillette M., Loda M., Weber G., Mark E.J., Lander E.S., Wong W., Johnson B.E., Golub T.R., Sugarbaker D.J., and Meyerson M. **Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses.** *Proceedings of National Academy of Science.* 98:13790-13795. 2001
298. Nacht M., Dracheva T., Gao Y., Fujii T., Chen Y., Player A., Akmaev V., Cook B., Dufault M., Zhang M., Zhang W., Guo M., Curran J., Han S, Sidransky D., Buetow K., Madden S.L. and Jen J. **Molecular characteristics of non-small cell lung cancer.** *Proceedings of National Academy of Science.* 98:15203-15208. 2001

299. Garber M.E., Troyanskaya O.G., Schluens K., Petersen S., Thaesler Z., Pacyna-Gengelbach M., van de Rijn M., Rosen G.D., Perou C.M., Whyte R.I., Altman R.B., Brown P.O., Botstein D. and Petersen I. **Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung.** *Proceedings of National Academy of Science.* 98:13784-13789. 2001
300. McDoniels-Silvers A.L., Stoner G.D., Lubet R.A. and You M. **Differential expression of critical cellular genes in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues.** *Neoplasia.* 4:141-150. 2002
301. Virtanen C., Ishikawa Y., Honjoh D., Kimura M., Shimane M., Miyoshi T., Nomura H. and Jones M.H. **Integrated classification of lung tumors and cell lines by expression profiling.** *Proceedings of National Academy of Science.* 99(19):12357-13262. 2002
302. Borczuk A.C., Gorenstein L., Walter K.L., Assaad A.A., Wang L. and Powell C.A. **Non-Small-Cell Lung Cancer Molecular Signatures Recapitulate Lung Developmental Pathways.** *American Journal of Pathology.* 163(5):1949-1960. 2003
303. Beer D.G., Kardia S.L.R., Huang C., Giordano T.J., Levin A.M., Misek D.E., Lin L., Chen G., Gharib T.G., Thomas D.G., Lizyness M.L., Kuick R., Hayasaka S., Taylor J.M.G., Iannettoni M.D., Orringer M.B. and Hanash S. **Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma.** *Nature Medicine.* 8(8):816-824. 2002
304. Miura K., Bowman E.D., Simon R., Peng A.C., Robles A.I., Jones R.T., Katagiri T., He P., Mizukami H., Charboneau L., Kikuchi T., Liotta L.A., Nakamura Y. and Harris C.C. **Laser Capture Microdissection and Microarray Expression Analysis of Lung Adenocarcinoma Reveals Tobacco Smoking- and Prognosis-related Molecular Profiles.** *Cancer Research.* 62:3244-3250. 2002
305. Powell C.A., Spira A., Derti A., DeLisi C., Liu G., Borczuk A., Busch S., Sahasrabudhe S., Chen Y., Sugarbaker D., Bueno R., Richards W.G. and Brody J.S. **Gene Expression in Lung Adenocarcinomas of Smokers and Nonsmokers.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 29:157-162. 2003

306. Miller V.A., Kris M.G., Shah N., Patel J., Azzoli C., Gomez J., Krug L.M., Pao W., Rizvi N., Pizzo B., Tyson L., Venkatraman E., Ben-Porat L., Memoli N., Zakowski M., Rusch V. and Heelan R.T. **Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer.** *Journal of Clinical Oncology.* 22, 1103-1109. 2004
307. Wigle D.A., Jurisica I., Radulovich N., Pintilie M., Rossant J., Liu N., Lu C., Woodgett J., Seiden I., Johnston M., Keshavjee S., Darling G., Winton T., Breitzkreutz B., Jorgenson P., Tyers M., Shepherd F.A. and Tsao M.S. **Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival.** *Cancer Research.* 62:3005-3008. 2002
308. Gordon G.J., Richards W.G., Sugarbaker D.J., Jaklitsch M.T. and Bueno R. **A Prognostic Test for Adenocarcinoma of the Lung From Gene Expression Profiling Data.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 12:905-910. 2003
309. Blackhall F.H., Wigle D.A., Jurisica I., Pintilie M., Liu N., Darling G., Johnston M.R., Keshavjee S., Waddell T., Winton T., Shepherd F.A. and Tsao M. **Validating the prognostic value of marker genes derived from a non-small cell lung cancer microarray study.** *Lung Cancer.* 46:197-204. 2004
310. Diederichs S., Bulk E., Steffen B., Ji P., Tickenbrock L., Lang K., Zänker K.S., Metzger R., Schneider P.M., Gerke V., Thomas M., Berdel W.E., Serve H. and Müller-Tidow C. **S100 Family Members and Trypsinogens Are Predictors of Distant Metastasis and Survival in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer.** *Cancer Research.* 64:5564-5569. 2004
311. O-charoenrat P., Rusch V., Talbot S.G, Sarkaria I., Viale A., Socci N., Ngai I., Rao P. and Singh B. **Casein Kinase II Alpha Subunit and C1-Inhibitor Are Independent Predictors of Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung.** *Clinical Cancer Research.* 10:5792-5803. 2004
312. Jiang H., Deng Y., Chen H., Tao L., Sha Q., Chen J., Tsai C. and Zhang S. **Joint analysis of two microarray gene-expression data sets to select lung adenocarcinoma marker genes.** *BMC Bioinformatics.* 5:81. 2004

313. Takada M, Tada M., Tamoto E., Kawakami A., Murakawa K., Shindoh G., Teramoto K., Matsunaga A., Komuro K., Kanai M., Fujiwara Y., Shirata K., Nishimura N., Miyamoto M., Okushiba S., Kondo S., Hamada J., Katoh H., Yoshiki T. and Moriuchi T. **Prediction of Lymph Node Metastasis by Analysis of Gene Expression Profiles in Non-small Cell Lung Cancer.** *Journal of Surgical Research.* 122:61-69. 2004
314. Sun Z., Yang P., Aubry M., Kosari F., Endo C., Molina J. and Vasmataz G. **Can gene expression profiling predict survival for patients with squamous cell carcinoma of the lung?** *Molecular Cancer.* 3:35. 2004
315. Yang P., Sun Z., Aubry M.C., Kosari F., Bamlet W., Endo C., Molina J.R. and Vasmataz G. **Study design considerations in clinical outcome research of lung cancer using microarray analysis.** *Lung Cancer.* 46:215-226. 2004
316. Talbot S.G, Estilo C., Maghami E., Sarkaria I.S., Pham D.K, O-charoenrat P., Socci N.D, Ngai I, Carlson D., Ghossein R, Viale A., Park B.J, Rusch V.W. and Singh B. **Gene Expression Profiling Allows Distinction between Primary and Metastatic Squamous Cell Carcinomas in the Lung.** *Cancer Research.* 65(8):3063-3071
317. Wikman H., Kettunen E., Seppänen J.K., Karjalainen A., Hollmén J., Anttila S. and Knuutila S. **Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array.** *Oncogene.* 21:5804-5813. 2002
318. Yamagata N., Shyr Y., Yanagisawa K., Edgerton M., Dang T.P., Gonzalez A., Nadaf S., Larsen P., Roberts J.R., Nesbitt J.C., Jensen R., Levy S., Moore J.H., Minna J.D. and Carbone D.P. **A Training-Testing Approach to the Molecular Classification of Resected Non-Small Cell Lung Cancer.** *Clinical Cancer Research.* 9:4695-4704. 2003
319. Hofmann H., Hansen G., Burdach S., Bartling B., Silber R. and Simm A. **Discrimination of Human Lung Neoplasm from Normal Lung by Two Target Genes.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 170:516-519. 2004

320. Ohira T., Akutagawa S., Usuda J., Nakamura T., Hirano T., Tsuboi M., Nishio K., Taguchi F., Ikeda N., Nakamura H., Konaka C., Saijo N. and Kato H. **Up-regulated gene expression of angiogenesis factors in post-chemotherapeutic lung cancer tissues determined by cDNA macroarray.** *Oncology Reports*. 9:723-728. 2002
321. Celis J.E., Moreira J.M., Gromova I., Cabezon T., Ralfkiaer U., Guldborg P., Straten P.T., Mouridsen H., Friis E., Holm D., Rank F. and Gromov P. **Towards discovery-driven translational research in breast cancer.** *FEBS Journal*. 272(1):2-15. 2005
322. Hörig H, Pullman W. **From bench to clinic and back: Perspective on the 1<sup>st</sup> IQPC Translational Research conference.** *Journal of Translational Medicine*. 2:44. 2004
323. Webb CP, Pass HI. **Translation research: from accurate diagnosis to appropriate treatment.** *Journal of Translational Medicine*. 2(1):35. 2004
324. Ioannidis J.P.A. **Materializing research promises: opportunities, priorities and conflicts in translational medicine.** *Journal of Translational Medicine*. 2:5. 2004
325. Pober J.S., Neuhauser C.S. and Pober J.M. **Obstacles facing translational research in academic medical centers.** *The FASEB Journal*. 15:2303-2313. 2001
326. Nimgaonkar A., Sanoudou D., Butte1 A.J., Haslett J.N., Kunkel L.M., Beggs A.H. and Kohane I.S. **Reproducibility of gene expression across generations of Affymetrix microarrays.** *BMC Bioinformatics*. 4:27. 2003
327. Bonferroni CE. **Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità.** *Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze*. 8:3-62.1936
328. Hartigan J.A. **Clustering algorithms.** *New York: John Wiley & Sons Inc*. 1975
329. Mardia K.V., Kent J.T. and Bibby J.M. **Multivariate Analysis.** *Academic Press*. 1979
330. Al-Shahrour F., Minguez P., Tárraga J., Montaner D., Alloza E., Vaquerizas J.M.M., Conde L., Blaschke C., Vera J. and Dopazo J. **BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments.** *Nucleic Acids Research*. 34:W472-W476. 2006

331. Harris M.A., Clark J., Ireland A., Lomax J., Ashburner M., Foulger R., Eilbeck K., Lewis S., Marshall B., Mungall C., Richter J., Rubin G.M., Blake J.A., Bult C., Dolan M., Drabkin H., Eppig J.T., Hill D.P., Ni L., Ringwald M., Balakrishnan R., Cherry J.M., Christie K.R., Costanzo M.C., Dwight S.S., Engel S., Fisk D.G., Hirschman J.E., Hong E.L., Nash R.S., Sethuraman A., Theesfeld C.L., Botstein D., Dolinski K., Feierbach B., Berardini T., Mundodi S., Rhee S.Y., Apweiler R., Barrell D., Camon E., Dimmer E., Lee V., Chisholm R., Gaudet P., Kibbe W., Kishore R., Schwarz E.M., Sternberg P., Gwinn M., Hannick L., Wortman J., Berriman M., Wood V., de la Cruz N., Tonellato P., Jaiswal P., Seigfried T., White R.; Gene Ontology Consortium. **The Gene Ontology (GO) database and informatics resource.** *Nucleic Acids Research*. 32(Database issue):D258-261. 2004
332. Hoffmann R. and Valencia, A. **A gene network for navigating the literature.** *Nature Genetics*. 36:664. 2004
333. Pontius J.U., Wagner L. and Schuler G.D. **UniGene: a unified view of the transcriptome.** *En: The NCBI Handbook. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information*. 2003
334. Yoshiji H., Harris S.R. and Thorgeirsson U.P. **Vascular Endothelial Growth Factor is Essential for Initial but not Continued in vivo Growth of Human Breast Carcinoma Cells.** *Cancer Research*. 57(18):3924-3928. 1997
335. Sartelet H., Decaussin M., Devouassoux G., Nawrocki-Raby B., Brichon P., Brambilla C. and Brambilla E. **Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptors (VEGF-R1 [Flt-1] and VEGF-R2 [KDR/Flk-1]) in Tumorlets and in Neuroendocrine Cell Hyperplasia of the Lung.** *Human Pathology*. 35(10):1210-1217. 2004
336. Niki T., Iba S., Tokunou M., Yamada T., Matsuno Y. and Hirohashi S. **Expression of Vascular Endothelial Growth Factors A, B, C, and D and Their Relationships to Lymph Node Status in Lung Adenocarcinoma.** *Clinical Cancer Research*. 6:2431-2439. 2000
337. Renyi-Vamos F., Tovari J., Fillinger J., Timar J., Paku S., Kenessey I., Ostoros G., Agocs L., Soltesz I. And Dome B. **Lymphangiogenesis Correlates with Lymph Node Metastasis, Prognosis, and Angiogenic Phenotype in Human Non-small Cell Lung Cancer.** *Clinical Cancer Research*. 11(20):7344-7353. 2005



338. Takizawa H., Kondo K., Fujino H., Kenzaki K., Miyoshi T., Sakiyama S. and Tangoku A. **The balance of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA is a predictor of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer.** *British Journal of Cancer.* 95:75-79. 2006
339. Sekhon H.S., Wright J.L. and Churg A. **Cigarette smoke causes rapid cell proliferation in small airways and associated pulmonary arteries.** *American Journal of Physiology.* 267:L557-563. 1994
340. Sekhon H., Wright J. and Churg A. **Effects of cigarette smoke and asbestos on airway, vascular and mesothelial cell proliferation.** *International Journal of Experimental Pathology.* 76(6):411-418. 1995
341. Lee J.J., Liu D., Lee J.S., Kurie J.M., Khuri F.R., Ibarguen H., Morice R.C., Walsh G., Ro J.Y., Broxson A., Hong W.K., Hittelman W.N. **Long-term impact of smoking on lung epithelial proliferation in current and former smokers.** *Journal of the National Cancer Institute.* 93(14):1081-1088. 2001
342. Niki T., Iba S., Yamada T., Matsuno Y., Enholm B. and Hirohashi S. **Expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 in blood and lymphatic vessels of lung adenocarcinoma.** *Journal of Pathology.* 193:450-457.2001
343. Minami K., Saito Y., Imamura H. and Okamura A. **Prognostic significance of p53, Ki-67, VEGF and Glut-1 in resected stage I adenocarcinoma of the lung.** *Lung Cancer.* 38:51-57. 2002
344. Ohta Y., Watanabe Y., Murakami S., Oda M., Hayashi Y., Nonomura A., Endo Y. and Sasaki T. **Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer.** *British Journal of Cancer.* 76(8):1041-1045. 1997
345. Huang C., Liu D., Masuya D., Nakashima T Kameyama K., Ishikawa S., Ueno M., Haba R. and Yokomise H. **Clinical application of biological markers for treatments of resectable non-small-cell lung cancers.** *British Journal of Cancer.* 92:1231-1239. 2005
346. Tomita M., Matsuzaki Y., Shimizu T., Hara M., Ayabe T. and Onitsuka T. **Vascular endothelial growth factor expression in pN2 non-small cell lung cancer: Lack of prognostic value.** *Respirology.* 10:31-35. 2005

347. Oshita F., Ito H., Ikehara M., Ohgane N., Hamanaka N., Nakayama H., Saito H., Yamada K., Noda K., Mitsuda A. and Kameda Y. **Prognostic Impact of Survivin, Cyclin D1, Integrin  $\beta$ 1, and VEGF in Patients with Small Adenocarcinoma of Stage I Lung Cancer.** *American Journal of Clinical Oncology*. 27:425-428. 2004
348. Kurahara H., Takao S., Maemura K., Shinchi H., Natsugoe S. and Aikou T. **Impact of vascular endothelial growth factor-C and -D expression in human pancreatic cancer: its relationship to lymph node metastasis.** *Clinical Cancer Research*. 10(24):8413-8420. 2004
349. Shibuya M., Ito N. and Claesson-Welsh L. **Structure and function of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor –1 and –2.** *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 237:59-83. 1999
350. Liu B., Earl H.M., Baban D., Shoaibi M., Fabra A., Kerr D.J. and Seymour L.W. **Melanoma cell lines express VEGF receptor KDR and respond to exogenously added VEGF.** *Biochemical et Biophysical Research Communications*. 217:721-727. 1995
351. Dikov M.M., Ohm J.E., Ray N., Tchekneva E.E., Burlison J., Moghanaki D., Nadaf S. and Carbone D.P. **Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1 and 2 in Dendritic Cell differentiation.** *The Journal of Immunology*. 174:215-222. 2005
352. De Jong J.S., Van Diest P.J., Van der Valk P. and Baak J. **Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops.** *Journal of Pathology*. 184:44-52. 1998
353. Masood R., Cai J., Zheng T., Smith D.L., Hinton D.R. and Gill P.S. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors.** *Blood*. 98:1904-1913. 2001
354. Strizzi L., Catalano A., Vianale G., Orecchia S., Casalini A., Tassi G., Puntoni R., Mutti L. and Procopio A. **Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma.** *Journal of Pathology*. 193:468-475. 2001
355. Gerber H.P., Malik A.K., Solar G.P., Sherman D., Liang X.H., Meng G., Hong K., Masters J.C. and Ferrara N. **VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism.** *Nature*. 417:954-958. 2002

356. Masood R., Kundra A., Zhu S., Xia G., Scalia P., Smith D.L. and Gill P.S. **Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops.** *International Journal of Cancer.* 104:603-610. 2003
357. Van Trappen P.O., Steele D., Lowe D.G., Baithun S., Beasley N., Thiele W., Weich H., Krishnan J., Shepherd J.H., Pepper M.S., Jackson D.G., Sleeman J.P. and Jacobs I.J. **Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis.** *Journal of Pathology.* 201:544-554. 2003
358. Pezzella F., Pastorino U., Tagliabue E., Andreola S., Sozzi G., Gasparini G., Monard S., Gatter K.C., Harris A.L., Fox S., Buyse M., Pilotti S., Pierotti M. and Rilke F. **Non-Small-Cell Lung Carcinoma Tumor Growth without Morphological Evidence of Neo-Angiogenesis.** *American Journal of Pathology.* 151(5):1417-1423. 1997
359. Passalidou E., Trivella M., Singh N., Ferguson M., Hu J., Cesario A., Granone P., Nicholson A.G., Goldstraw P., Ratcliffe C., Tetlow M., Leigh I., Harris A.L., Gatter K.C. and Pezzella F. **Vascular phenotype in angiogenic and non-neoangiogenic lung non-small cell carcinoma.** *British Journal of Cancer.* 86:244-249. 2002
360. Moffat B.A., Chen M., Kariaapper M.S., Hamstra D.A., Hall D.E., Stojanovska J., Johnson T.D., Blaiwas M., Kumar M., Chenevert T.L., Rehemtulla A. and Ross B.D. **Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A causes a paradoxical increase in tumor blood flow and up-regulation of VEGF-D.** *Clinical Cancer Research.* 12(5):1525-1532. 2006
361. Partanen T.A., Arola J., Saaristo A., Jussila L., Ora A., Miettinen M., Stacker S.A., Achen M.G. and Alitalo K. **VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues.** *FASEB Journal.* 14:2087-2096. 2000
362. Johnson B.E. **Management of Small Cell Lung Cancer.** *Clinics in Chest Medicine.* 23(1):225-237. 2002

363. Nonomura A., Mizukami Y., Shimizu J., Oda M., Murakami S., Watanabe Y., Kobayashi T., Kamimura R., Takashima T. and Kitagawa M. **Clinicopathological study of primary malignant tumors of the lung: an analysis of 993 tumors resected at the Kanazawa University Hospital between 1979-1993.** *Journal of Surgery Oncology.* 58(1):5-11. 1995
364. Libshitz H.I., McKenna R.J. and Mountain C.F. **Patterns of mediastinal metastasis in bronchogenic carcinoma.** *Chest.* 90:229-232. 1986
365. Wilde J., Haenselt V., Luft D., Luft P. and Welker L. **The relationship of histological type and tumor location to prognosis in 1000 patients with lung resection with special reference to adenocarcinoma.** *Pneumologie.* 44(12):1287-1293.1990
366. Vansteenkiste J.F., De Leyn P.R., Deneffe G.J., Stalpaert G., Nackaerts K.L., Lerut T.E. and Demedts M.G. **Survival and Prognostic Factors in Resected N2 Non-Small Cell Lung Cancer: A Study of 140 Cases.** *Annals of Thoracic Surgery.* 63(5):1441-1450. 1997
367. Iwasaki A., Kuwahara M., Yoshinaga Y. and Shirakusa T. **Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC.** *European Journal of Cardio-thoracic Surgery.* 25:443-448. 2004
368. Lucchi M., Mussi A., Fontanini G., Faviana P., Ribechini A. and Angeletti C.A. **Small cell lung carcinoma (SCLC): the angiogenic phenomenon.** *European Journal of Cardio-thoracic Surgery.* 21: 1105-1110. 2002
369. Takenaka K., Katakura H., Chen F., Ogawa E., Adachi M., Wada H. and Tanaka F. **The ratio of membrane-bound form Flt-1 mRNA to VEGF mRNA correlates with tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer.** *Cancer Letters.* XX:1-7. 2006
370. Ishii H., Yazawa T., Sato H., Suzuki T., Ikeda M., Hayashi Y., Takanashi Y. and Kitamura H. **Enhancement of pleural dissemination and lymph node metastasis of intrathoracic lung cancer cells by vascular endothelial growth factors (VEGFs).** *Lung Cancer.* 45:325-337. 2004

371. Yokoyama Y., Charnock-Jones D.S., Licence D., Yanaihara A., Hastings J.M., Holland C.M., Emoto M., Sakamoto A., Sakamoto T., Maruyama H., Sato S., Mizunuma H. and Smith S.K. **Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma.** *Clinical Cancer Research*. 9(4):1361-1369. 2003
372. Shintani S., Li C., Ishikawa T., Mihara M., Nakashiro K. and Hamakawa H. **Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma.** *Oral Oncology*. 40(1):13-20. 2004
373. de Vries C., Escobedo J.A., Ueno H., Houck K., Ferrara N. and Williams L.T. **The fms-like tyrosine kinase, a receptor form vascular endothelial growth factor.** *Science*. 255:989-991. 1992
374. Terman B.I., Dougher-Vermazen M., Carrion M.E., Dimitrov D., Armellino D.C, Gospodarowicz D. and Bohlen P. **Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor.** *Biochemical et Biophysical Research Communications*. 30:1579-1586. 1992
375. Waltenberger J., Claesson-Welsh L., Siegbahn A., Shibuya M. and Heldin C.H. **Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor.** *Journal of Biological Chemistry*. 269:26988-26995. 1994
376. Tanaka F., Otake Y., Yanagihara K., Kawano Y., Miyahara R., Li M., Yamada T., Hanaoka N., Inui K. and Wada H. **Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody.** *Clinical Cancer Research*. 7:3410-3415. 2001
377. Yamaguchi T.P., Dumont D.J., Conlon R.A., Breitman M.L. and Rossant J. **flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors.** *Development*. 118:489-498. 1993
378. Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L. and Schuh A.C. **Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice.** *Nature*. 376:62-66. 1995
379. Shalaby F., Ho J., Stanford W.L., Fischer K.D., Schuh A.C., Schwartz L., Bernstein A. and Rossant J. **A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis.** *Cell*. 89:981-990. 1997

380. Kataoka H., Takakura N., Nishikawa S., Tsuchida K., Kodama H., Kunisada T., Risau W., Kita T. and Nishikawa S.I. **Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flka genes clustering in mouse chromosome e define distinct subsets of nascent mesodermals cells.** *Development, Growth and Differentiation*. 39:729-740. 1997
381. Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M. and Breitman M.L. **Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium.** *Nature*. 376:66-70. 1995
382. Fong G.H., Zhang L., Bryce D.M. and Peng J. **Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice.** *Development*. 126:3015-3025. 1999
383. Hiratsuka S., Minowa O., Kuno J., Noda T. and Shibuya M. **Flt-1 lacking the tyrosine kinase domine is sufficient for normal development and angiogenesis in mice.** *Proceedings of National Academy of Science*. 95:9349-9354. 1998
384. Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Matsumura K., Kawasaki K., Shibuya M. and Nishikawa S. **A chemically defined culture of VEGFR2<sup>+</sup> cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells.** *Blood*. 101:2261-2267. 2003
385. McCloud T.C. **Imaging Techniques for Diagnosis and Staging of Lung Cancer.** *Clinics in Chest Medicine*. 23(1):123-136. 2002
386. Pun Y. **Cirugía, aislada o en tratamiento multimodal, en cáncer de pulmón no microcítico.** *Monografías NEUMOMADRID: Cáncer de pulmón*. Vol. III: 110-124. 2002
387. Van der Velde-Zimmermann D., Roijers J.F., Bouwens-Rombouts A., De Weger R.A., De Graaf P.W., Tilanus M.G. and Van den Tweel J.G. **Molecular test for the detection of tumor cells in blood and sentinel nodes of melanoma patients.** *American Journal of Pathology*. 149(3):759-764. 1996
388. Reintgen D., Balch C.M., Kirkwood J. and Ross M. **Recent advances in the care of the patient with malignant melanoma.** *Annals of Surgery*. 225(1):1-14. 1997

389. Luketich J.D., Kassis E.S., Shriver S.P., Nguyen N.T., Schauer P.R., Weigel T.L., Yousem S.A. and Siegfried J.M. **Detection of micrometastases in histologically negative lymph nodes in esophageal cancer.** *Annals of Thoracic Surgery.* 66:1715-1718. 1998
390. Blaheta H.J., Schitteck B., Breuninger H., Sotlar K., Ellwanger U., Thelen M.H., Maczey E., Rassner G., Bueltmann B. and Garbe C. **Detection of melanoma micrometastasis in sentinel nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction correlates with tumor thickness and is predictive of micrometastatic disease in the lymph node basin.** *American Journal of Surgery Pathology.* 23(7):822-828. 1999
391. Bostick P.J., Chatterjee S., Chi D.D., Huynh K.T., Giuliano A.E., Cote R. and Hoon D.S.B. **Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and RT-PCR in early stage melanoma patients.** *Journal of Clinical Oncology.* 10:3238-3244. 1999
392. Blaheta H.J., Ellwanger U., Schitteck B., Sotlar K., MacZey E., Breuninger H., Thelen M.H., Bueltmann B., Rassner G. and Garbe C. **Examination of regional lymph nodes by sentinel node biopsy and molecular analysis provides new staging facilities in primary cutaneous melanoma.** *The Journal of Investigative Dermatology.* 114(4):637-642. 2000
393. Gómez G. **Tesis Doctoral: Desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías de métodos moleculares para la detección de enfermedad microdiseminada y micrometástasis.** Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica. 2005
394. Zhukova L.G., Zhukov N.V. and Lichinitser M.R. **Expression of Flt-1 and Flk-1 receptors for vascular endothelial growth factor on tumor cells as a new prognostic criterion for locally advanced breast cancer.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 135(5):478-481. 2003
395. Carrillo F., González J.M., Sánchez J., Sánchez I. and Losada A. **Manual SEPAR de Procedimientos 7: Quimioterápico en el Cáncer Broncogénico.** Ed. Novartis Farmacéutica S.A. Capítulo 8:14. 2005

396. Kondo S., Asano M., Matsuo K., Ohmori I. and Suzuki H. **Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1221:211-214. 1994
397. Yamamoto Y., Toi M., Kondo S., Matsumoto T., Suzuki H., Kitamura M., Tsuruta K., Taniguchi T., Okamoto A., Mori T., Yoshida M., Ikeda T. and Tominaga T. **Concentrations of vascular endothelial growth factor factor in the sera of normal controls and cancer patients.** *Clinical Cancer Research.* 2:821-826. 1996
398. Wasada T., Kawahara R., Katsumori K., Naruse M. and Omori Y. **Plasma concentration of immunoreactive vascular endothelial growth factor and its relation to smoking.** *Metabolism.* 47:27-30. 1998
399. Jefferson M.F., Pendleton N., Faragher E.B., Dixon G.R., Myskow M.W. and Horan M.A. **'Tumour volume' as a predictor of survival after resection of non-small-cell lung cancer (NSCLC).** *British Journal of Cancer.* 74:456-459. 1996
400. Kraft A., Weindel K., Ochs A., Marth C., Zmija J., Schumacher P., Unger C., Marme D. and Gastl G. **Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease.** *Cancer.* 85:178-187. 1999
401. Malyankar U.M. and MacDougall J.R. **Genome-Scale Analysis of Lung Cancer Progression.** *American Journal of Pharmacogenomics.* 4(3):169-176. 2004
402. Grant G.M., Fortney A., Gorreta F., Estep M., del Giacco L., Van Meter A., Christensen A., Appalla L., Naouar C., Jamison C., Al-Timimi A., Donovan J., Cooper J., Garrett C. and Chandhoke. **Microarrays in Cancer Research.** *Anticancer Research.* 24:441-448. 2004
403. Nakamura N., Kobayashi K., Nakamoto M., Kohno T., Sasaki H., Matsuno Y. and Yokota J. **Identification of tumor markers and differentiation markers for molecular diagnosis of lung adenocarcinoma.** *Oncogene.* 25:4245-4255. 2006



404. Inamura K., Fujiwara T., Hoshida Y., Isagawa T., Jones M.H., Virtanen C., Shimane M., Satoh Y., Okumura S., Nakagawa K., Tsuchiya E., Ishikawa S., Aburatani H., Nomura H. and Ishikawa Y. **Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization.** *Oncogene*. 24:7105-7113. 2005
405. Wikman H., Seppänen J.K., Sarhadi V.K., Kettunen E., Salmenkivi K., Kuosma E., Vainio-Siukola K., Nagy B., Karjalainen A., Sioris T., Salo J., Hollmén J., Knuutila S. and Anttila S. **Caveolins as tumour markers in lung cancer detected by combined use of cDNA and tissue microarrays.** *Journal of Pathology*. 203:584-593. 2004
406. Nakamura H., Saji H., Ogata A., Hosaka M., Hagiwara M., Saijo T., Kawasaki N. and Kato H. **cDNA Microarray Analysis of Gene Expression in Pathologic Stage IA Nonsmall Cell Lung Carcinomas.** *Cancer*. 97:2798-2805. 2003
407. Kobayashi K., Nishioka M., Kohno T., Nakamoto M., Maeshima A., Aoyagi K., Sasaki H., Takenoshita S., Sugimura H. and Yokota J. **Identification of genes whose expression is upregulated in lung adenocarcinoma cells in comparison with type II alveolar cells and bronchiolar epithelial cells *in vivo*.** *Oncogene*. 23:3089-3096. 2004
408. Yap Y.L., Wong M.P., Zhang X.W., Hernandez D., Gras R., Smith D.K. and Danchin A. **Conserved transcription factor binding sites of cancer markers derived from primary lung adenocarcinoma microarrays.** *Nucleic Acids Research*. 33:409-421. 2005
409. Hellmann G.M., Fields W.R. and Doolittle D.J. **Gene Expression Profiling of Cultured Human Bronchial Epithelial and Lung Carcinoma Cells.** *Toxicological Sciences*. 61:154-163. 2001
410. Townsley F.M. Aristarkhov A., Beck S., Hershko A. and Ruderman J.V. **Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase.** *Proceedings of National Academy of Science*. 94: 2362-2367. 1997
411. Watt P.M. and Hickson I.D. **Structure and function of type II DNA topoisomerases.** *Biochemical Journal*. 303:681-695. 1994

412. Fry A.M. **The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure.** *Oncogene*. 21(40):6184-6194. 2002
413. Dutertre S., Descamps S. and Prigent C. **On the role of aurora-A in centrosome function.** *Oncogene*. 21(40):6175-6183. 2002
414. Gorbsky G.J. **The mitotic spindle checkpoint.** *Current biology*. 11(24):R1001-R1004. 2001
415. Mollinari C., Kleman J.P., Jiang W., Schoehn G., Hunter T. and Margolis R.L. **PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone.** *The Journal of Cell Biology*. 157(7):1175-1186. 2002
416. Hogg D., Guidos C., Bailey D., Amendola A., Groves T., Davidson J., Schmandt R. and Mills G. **Cell cycle dependent regulation of the protein kinase TTK.** *Oncogene*. 9(1):89-96. 1994
417. Kallio M.J., Beardmore V.A., Weinstein J. and Gorbsky G.J. **Rapid microtubule-independent dynamics of Cdc20 at kinetochores and centrosomes in mammalian cells.** *The Journal of Cell Biology*. 158(5):841-847. 2002
418. Chang M.S., Huang C.J., Chen M.L., Chen S.T., Fan C.C., Chu J.M., Lin W.C. and Yang Y.C. **Cloning and Characterization of hMAP126, a New Member of Mitotic Spindle-Associated Proteins.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 287:116-121. 2001
419. Gruss O.J., Carazo-Salas R.E., Schatz C.A., Guarguaglini G., Kast J., Wilm M., Le Bot N., Vernos I., Karsenti E. and Mattaj I.W. **Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin  $\alpha$  on TPX2 Activity.** *Cell*. 104:83-93. 2001
420. Payton M. and Coats S. **Cyclin E2, the cycle continues.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 34(4):315-320. 2002
421. Islam A., Kageyama H., Takada N., Kawamoto T., Takayasu H., Isogail E., Ohira M., Hashizume K., Kobayashi H., Kaneko Y. and Nakagawara A. **High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma.** *Oncogene*. 19(5):617-623. 2000
422. Howard L., Maciewicz R.A. and Blobel C.P. **Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28.** *Biochemical Journal*. 348:21-27. 2000

423. Nikkola J., Vihinen P., Vlaykova T., Hahka-Kemppinen M., Kähäri V. and Pyrhönen S. **High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma.** *International journal of cancer.* 97(4):432-438. 2002
424. Kerkelä E., Ala-aho R., Klemi P., Grénman S., Shapiro S.D., Kähäri V. and Saarialho-Kere U. **Metalloelastase (MMP-12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome.** *Journal of Pathology.* 198(2):258-269. 2002
425. Kerkelä E., Ala-aho R., Jeskanen L., Rechardt O., Grénman S., Shapiro S.D., Kähäri V. and Saarialho-Kere U. **Expression of Human Macrophage Metalloelastase (MMP-12) by Tumor Cells in Skin Cancer.** *Journal of Investigative Dermatology.* 114:1113-1119. 2000
426. Tan X., Egami H., Kamohara H., Ishikawa S., Kurizaki T., Yoshida N., Tamori Y., Takai E., Hirota M. and Ogawa M. **Involvement of the mitogen-activated protein kinase kinase 2 in the induction of cell dissociation in pancreatic cancer.** *International Journal of Oncology.* 24(1):65-73. 2004
427. Mutter G.L. **PTEN, a Protean Tumor Suppressor.** *American Journal of Pathology.* 158:1895-1898. 2001
428. Feng G., Xu X., Youssef E.M. and Lotan R. **Diminished Expression of S100A2, a Putative Tumor Suppressor, at Early Stage of Human Lung Carcinogenesis.** *Cancer Research.* 61:7999-8004. 2001
429. Yan S.S., Wu Z.Y., Zhang H.P., Furtado G., Chen X., Yan S.F., Schmidt A.M., Brown C., Stern A., LaFaille J., Chess L., Stern D.M. and Jiang H. **Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system.** *Nature Medicine.* 9(3):287-293. 2003
430. Kunikata T., Torigoe K., Ushio S., Okura T., Ushio C., Yamauchi H., Ikeda M., Ikegami H. and Kurimoto M. **Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody.** *Cell Immunology.* 189(2):135-143. 1998

431. Connelly J.C., Skidgel R.A., Schulz W.W., Johnson A.R. and Erdos E.G. **Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide.** *Proceedings of National Academy of Science.* 82(24):8737-8741. 1985
432. Luo H., Yu G., Wu Y. and Wu J. **EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells.** *Journal of Clinical Investigation.* 110(8):1141-1150. 2002
433. Fagarasan S., Shinkura R., Kamata T., Nogaki F., Ikuta K., Tashiro K. and Honjo T. **Alymphoplasia (aly)-type nuclear factor kappaB-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signaling and homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system.** *Journal of Experimental Medicine.* 191(9):1477-1486. 2000
434. Liou H.C., Jin Z., Tumang J., Andjelic S., Smith K.A. and Liou M.L. **c-Rel is crucial for lymphocyte proliferation but dispensable for T cell effector function.** *International Immunology.* 11(3):361-371. 1999
435. Quaggin S.E., Schwartz L., Cui S., Igarashi P., Deimling J., Post M. and Rossant J. **The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis.** *Development.* 126(24):5771-5783. 1999
436. Abdullah L.H., Bundy J.T., Ehre C. and Davis C.W. **Mucin secretion and PKC isoforms in SPOC1 goblet cells: differential activation by purinergic agonist and PMA.** *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 285(1):L149-160. 2003
437. Howard L., Zheng Y., Horrocks M., Maciewicz R.A. and Blobel C. **Catalytic activity of ADAM28.** *FEBS Letters.* 498(1):82-86. 2001
438. Ono Y., Fujii M., Kameyama K., Otani Y., Sakurai Y. and Kanzaki J. **Expression of matrix metalloproteinase-1 mRNA related to eosinophilia and interleukin-5 gene expression in head and neck tumour tissue.** *Virchows Archives.* 431(5):305-310. 1997
439. Vaalamo M., Kariniemi A.L., Shapiro S.D. and Saarialho-Kere U. **Enhanced expression of human metalloelastase (MMP-12) in cutaneous granulomas and macrophage migration.** *The Journal of Investigative Dermatology.* 112(4):499-505. 1999

440. Burger D., Rezzonico R., Li J.M., Modoux C., Pierce R.A., Welgus H.G. and Dayer J.M. **Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines.** *Arthritis and Rheumatism*. 41(10):1748-1759. 1998
441. Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A. and Rafii S. **Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors.** *Blood*. 95(3):952-958. 2000
442. Yip S., Sabetrasekh R., Sidman R.L. and Snyder E.Y. **Neural stem cells as novel cancer therapeutic vehicles.** *European Journal of Cancer*. 42:1298-1308. 2006
443. Tusher V., Tibshirani R. and Chu G. **Significance analysis of microarrays applied to ionizing radiation response.** *Proceedings of National Academy of Science*. 98:5116-5121. 2001
444. Troyanskaya O.G., Garber M.E., Brown P.O., Botstein D. and Altman R.B. **Nonparametric methods for identifying differentially expressed genes in microarray data.** *Bioinformatics*. 18(11):1454-1461. 2002
445. Racine C., Belanger M., Hirabayashi H., Boucher M., Chakir J. and Couet J. **Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines.** *Biochemical et Biophysical Research Communications*. 255(3):580-586.1999
446. Wang B.Y., Gil J., Kaufman D., Gan L., Kohtz D.S. and Burstein D.E. **P63 in pulmonary epithelium, pulmonary squamous neoplasms, and other pulmonary tumors.** *Human Pathology*. 33(9):921-926. 2002
447. Qian Z., Okuhara D., Abe M.K. and Rosner M.R. **Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel.** *The Journal of Biological Chemistry*. 274(3):1621-1627. 1999
448. Seidel M.G. and Look A.T. **E2A-HLF usurps control of evolutionarily conserved survival pathways.** *Oncogene*. 20(40):5718-5725. 2001
449. Simon D.M., Arikian M.C., Srisuma S., Bhattacharya S., Tsai L.W., Ingenito E.P., Gonzalez F., Shapiro S.D. and Mariani T.J. **Epithelial cell PPAR[gamma] contributes to normal lung maturation.** *FASEB Journal*. 20(9):1507-1509. 2006

450. Lea W., Abbas A.S., Sprecher H., Vockley J. and Schulz H. **Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1485:121-128. 2000
451. Rahman I., Biswas S.K. and Kode A. **Oxidant and antioxidant balance in the airways and airways diseases.** *European Journal of Pharmacology.* 533:222-239. 2006
452. Yang M.X. and Cederbaum A.I. **Role of cytochrome b5 in NADH-dependent microsomal reduction of ferric complexes, lipid peroxidation, and hydrogen peroxide generation.** *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 324(2):282-292. 1995
453. Tait J.F., Frankenberry D.A., Miao C.H., Killary A.M., Adler D.A. and Disteche C.M. **Chromosomal localization of the human annexin III (ANX3) gene.** *Genomics.* 10(2):441-448. 1991
454. Valentin H., Gelin C., Coulombel L., Zoccola D., Morizet J. and Bernard A. **The distribution of the CDW52 molecule on blood cells and characterization of its involvement in T cell activation.** *Transplantation.* 54(1):97-104. 1992
455. Niimi T., Nagashima K., Ward J.M., Minoo P., Zimonjic D.B., Popescu N.C. and Kimura S. **Claudin-18, a Novel Downstream Target Gene for the T/EBP/NKX2.1 Homeodomain Transcription Factor, Encodes Lung- and Stomach-Specific Isoforms through Alternative Splicing.** *Molecular and Cell Biology.* 21(21): 7380-7390. 2001
456. Lu S.C., Shieh W.Y., Chen C.Y., Hsu S.C. and Chen H.L. **Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro.** *FEBS Letters.* 530(1-3):158-162. 2002
457. Bleharski J.R., Kiessler V., Buonsanti C., Sieling P.A., Stenger S., Colonna M. and Modlin R.L. **A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response.** *Journal of Immunology.* 170(7):3812-3818. 2003
458. Davies G., Cunnick G.H., Mansel R.E., Mason M.D. and Jiang W.G. **Levels of expression of endothelial markers specific to tumour-associated endothelial cells and their correlation with prognosis in patients with breast cancer.** *Clinical and Experimental Metastasis.* 21(1):31-37. 2004

459. Feuerstein G. and Hallenbeck J.M. **Leukotrienes in health and disease.** *FASEB Journal.* 1(3):186-192. 1987
460. Bonnet C., Bertin P., Cook-Moreau J., Chable-Rabinovitch H., Treves R. and Rigaud M. **Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells.** *Prostaglandins.* 50(3):127-135. 1995
461. Bigby T.D., Lee D.M., Minami M., Ohishi N., Shimizu T. and Baker J.R. **Characterization of human airway epithelial cell leukotriene A4 hydrolase.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 11(5):615-624. 1994
462. Sanglard D., Ischer F., Koymans L. and Bille J. **Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 42(2):241-253. 1998
463. Mercado J.J., Smith R., Sogliocco F.A., Brown A.J. and Gancedo J.M. **The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors.** *European Journal of Biochemistry.* 224(2):473-481. 1994
464. Song Y., Ma T., Matthay M.A. and Verkman A.S. **Role of aquaporin-4 in airspace-to-capillary water permeability in intact mouse lung measured by a novel gravimetric method.** *The Journal of General Physiology.* 115(1):17-27. 2000
465. Chiaramonte M., Koviach J.L., Moore C., Iyer V.V., Wagner C.R., Halcomb R.L, Miller W., Melancon P. and Kuchta R.D. **Inhibition of CMP-sialic acid transport into Golgi vesicles by nucleoside monophosphates.** *Biochemistry.* 40(47):14260-14267. 2001
466. Wiseman J.S., Skoog M.T., Nichols J.S. and Harrison B.L. **Kinetics of leukotriene A4 synthesis by 5-lipoxygenase from rat polymorphonuclear leukocytes.** *Biochemistry.* 26(18):5684-5689. 1987
467. Razani B., Wang X.B., Engelman J.A., Battista M., Lagaud G., Zhang X.L., Kneitz B., Hou H. Jr., Christ G.J., Edelman W. and Lisanti M.P. **Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae.** *Molecular and Cellular Biology.* 22(7):2329-2344. 2002
468. Wang B.Y., Gil J., Kaufman D., Gan L., Kohtz S. and Burstein D.E. **p63 in Pulmonary Epithelium, Pulmonary Squamous Neoplasms, and Other Pulmonary Tumors.** *Human Pathology.* 33:921-926. 2002

469. Pelosi G., Pasini F., Stenholm C.O., Pastorino U., Maisonneuve P., Sonzogni A., Maffini F., Pruneri G., Fraggetta F., Cavallon A., Roz A., Iannucci A., Bresaola E. and Viale G. **p63 immunoreactivity in lung cancer: yet another player in the development of squamous cell carcinomas?** *Journal of Pathology*. 198:100-109. 2002
470. Agilent Technologies®. **Multiple Testing Corrections**. 2005  
(<http://www.chem.agilent.com/cag/bsp/SiG/Downloads/pdf/mtc.pdf>)
471. Zhang Z.L., Liu Z.S. and Sun Q. **Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma**. *World Journal of Gastroenterology*. 12(26):4241-4245. 2006
472. Chen G., Gharib T.G., Huang C., Taylor J.M.G., Misek D.E., Kardia S.L.R., Giordano T.J., Iannettoni M.D., Orringer M.B., Hanash S.M. and Beer D.G. **Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas**. *Molecular and Cellular Proteomics*. 1:304-313. 2002



## Recursos de internet

- Affymetrix:  
<http://www.affymetrix.com/index.affx>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios:  
<http://www.agemed.es/>
- Agilent:  
<http://www.home.agilent.com/agilent/home.jspx?cc=US&lc=eng&cmpid=4533>
- Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC):  
<http://www.iaslc.org/>
- Babelomics:  
<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/index.html>
- *The Gene Ontology Consortium*:  
<http://www.geneontology.org/>
- Google Académico:  
<http://scholar.google.es/schhp?hl=es>
- *Information Hyperlinked over Proteins* (iHOP):  
<http://www.ihop-net.org/>
- *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG):  
<http://www.genome.jp/kegg/>
- *National Center for Biotechnology Information* (NCBI):  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- NetAffx:  
<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>
- Organización Mundial de la Salud (OMS):  
<http://www.who.int/>
- Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR):  
<http://www.separ.es/>
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM):  
<http://www.seom.org/seomcms/index.php>
- Sociedad Madrileña de Neumología y Cirugía Torácica (NEUMOMADRID):  
<http://www.neumomadrid.org/>
- Unidad de Bioestadística Clínica. Hospital Universitario Ramón y Cajal:  
[http://www.hrc.es/investigacion/inves\\_unidadbio.htm](http://www.hrc.es/investigacion/inves_unidadbio.htm)
- *U.S. Food and Drug Administration* (FDA):  
<http://www.fda.gov/>





## ANEXO I

### Muestras analizadas, estirpe histológica y estadio para cada uno de los casos estudiados

**X.-** Muestras estudiadas mediante las distintas técnicas. El tejido en parafina se utilizó para el estudio histológico e inmunohistoquímico de las muestras para los factores y receptores de la familia del VEGF. Las muestras de tejido congelado se utilizaron para su análisis mediante *microarrays*. El suero se utilizó para el estudio de VEGF-A mediante la técnica de ELISA.

**D.-** Muestras en las que se realizó el estudio histológico e inmunohistoquímico de VEGF-D tras los *microarrays*.

**C.-** Controles sanos.

| Paciente | Tejido parafina |           |       | Tejido congelado |           |       | Suero | Estirpe histológica | TNM    |
|----------|-----------------|-----------|-------|------------------|-----------|-------|-------|---------------------|--------|
|          | Sano            | Peritumor | Tumor | Sano             | Peritumor | Tumor |       |                     |        |
| 1        | X,D             | X,D       | X,D   | X                | X         | X     | X     | Adenocarcinoma      | Ib     |
| 2        | X,D             | X,D       | X,D   | X                | X         | X     | X     | Adenocarcinoma      | Ib     |
| 3        | X               | X         | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | Ia     |
| 4        | X               | X         | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | Ib     |
| 5        | X               | X         | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | Ia     |
| 6        | X               | X         | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb   |
| 7        | X               | X         | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Grandes          | IIIb   |
| 8        | X,D             | X,D       | X,D   | X                | X         | X     | X     | Adenocarcinoma      | IIa    |
| 9        | X               | X         | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Epidermoide         | IIb    |
| 10       | X               | X         | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIa   |
| 11       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | C. Grandes          | Ib     |
| 12       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Adenocarcinoma      | Ib     |
| 13       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | Ia     |
| 14       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Grandes          | Ia     |
| 15       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | C. Grandes          | Oculto |
| 16       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | Ia     |
| 17       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | Ib     |
| 18       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIb    |
| 19       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Adenocarcinoma      | IIb    |
| 20       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIb    |
| 21       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | C. Pequeñas         | IIIb   |
| 22       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Adenocarcinoma      | IIIa   |
| 23       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb   |
| 24       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | IIIb   |
| 25       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Epidermoide         | IIIb   |
| 26       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIa   |
| 27       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | IIIb   |
| 28       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Epidermoide         | IIIb   |
| 29       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | C. Pequeñas         | IIIb   |
| 30       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb   |
| 31       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Grandes          | IIIb   |
| 32       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Adenocarcinoma      | IIIa   |
| 33       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb   |

| Paciente | Tejido parafina |           |       | Tejido congelado |           |       | Suero | Estirpe histológica | TNM  |
|----------|-----------------|-----------|-------|------------------|-----------|-------|-------|---------------------|------|
|          | Sano            | Peritumor | Tumor | Sano             | Peritumor | Tumor |       |                     |      |
| 34       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb |
| 35       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Epidermoide         | IIIb |
| 36       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Epidermoide         | IIIb |
| 37       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Adenocarcinoma      | IIIb |
| 38       | ---             | ---       | X,D   | X                | X         | X     | X     | Adenocarcinoma      | IIIa |
| 39       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Epidermoide         | IIIb |
| 40       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb |
| 41       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb |
| 42       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Epidermoide         | IIIb |
| 43       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb |
| 44       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | C. Grandes          | IV   |
| 45       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | IV   |
| 46       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | C. Grandes          | IV   |
| 47       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IV   |
| 48       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Adenocarcinoma      | IV   |
| 49       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Adenocarcinoma      | IV   |
| 50       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Epidermoide         | IV   |
| 51       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Adenocarcinoma      | IV   |
| 52       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | Adenocarcinoma      | IV   |
| 53       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Grandes          | IV   |
| 54       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | ---   | C. Pequeñas         | IV   |
| 55       | ---             | ---       | X,D   | ---              | ---       | X     | X     | Adenocarcinoma      | IV   |
| 56       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | IV   |
| 57       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Adenocarcinoma      | IV   |
| 58       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IV   |
| 59       | ---             | ---       | X     | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | ---  |
| 60       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | Ib   |
| 61       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | C. Grandes          | IIIb |
| 62       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb |
| 63       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb |
| 64       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIa |
| 65       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | IIIa |
| 66       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IV   |
| 67       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | IV   |
| 68       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | C. Grandes          | IV   |
| 69       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | C. Grandes          | Ib   |
| 70       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | C. Pequeñas         | IV   |
| 71       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | IV   |
| 72       | D               | D         | D     | X                | X         | X     | X     | Adenocarcinoma      | IIIb |
| 73       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IIIb |
| 74       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | Adenocarcinoma      | IV   |
| 75       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | Epidermoide         | IV   |
| 76       | D               | D         | D     | X                | X         | X     | ---   | Adenocarcinoma      | Ib   |
| 77       | D               | D         | D     | X                | X         | X     | ---   | Adenocarcinoma      | IIIb |
| 78       | D               | D         | ---   | X                | X         | ---   | ---   | Adenocarcinoma      | Ia   |
| 79       | D               | D         | ---   | X                | X         | ---   | ---   | Adenocarcinoma      | Ib   |
| 80       | D               | D         | D     | X                | X         | X     | ---   | Adenocarcinoma      | IIIb |
| C1       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | ---  |
| C2       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | ---  |
| C3       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | ---  |
| C4       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | ---  |
| C5       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | ---  |
| C6       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | ---  |
| C7       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | ---  |
| C8       | ---             | ---       | ---   | ---              | ---       | ---   | X     | ---                 | ---  |

**ANEXO II****Tablas de supervivencia estudio inmunohistoquímico**

Tabla de supervivencia global

|    | Tiempo<br>(meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|----|-------------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|    |                   |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| 1  | 1,567             | 1      | ,971   | ,028           | 1                        | 34                    |
| 2  | 1,933             | 1      | ,943   | ,039           | 2                        | 33                    |
| 3  | 2,267             | 1      | ,914   | ,047           | 3                        | 32                    |
| 4  | 2,533             | 1      | ,886   | ,054           | 4                        | 31                    |
| 5  | 2,733             | 1      | ,857   | ,059           | 5                        | 30                    |
| 6  | 2,800             | 1      | ,829   | ,064           | 6                        | 29                    |
| 7  | 3,133             | 1      | ,800   | ,068           | 7                        | 28                    |
| 8  | 3,633             | 1      | ,771   | ,071           | 8                        | 27                    |
| 9  | 4,300             | 1      | ,743   | ,074           | 9                        | 26                    |
| 10 | 4,600             | 1      | ,714   | ,076           | 10                       | 25                    |
| 11 | 5,000             | 1      | ,686   | ,078           | 11                       | 24                    |
| 12 | 6,533             | 1      | ,657   | ,080           | 12                       | 23                    |
| 13 | 6,633             | 1      | ,629   | ,082           | 13                       | 22                    |
| 14 | 6,767             | 1      | ,600   | ,083           | 14                       | 21                    |
| 15 | 7,300             | 1      | ,571   | ,084           | 15                       | 20                    |
| 16 | 8,100             | 1      | ,543   | ,084           | 16                       | 19                    |
| 17 | 8,400             | 1      | ,514   | ,084           | 17                       | 18                    |
| 18 | 8,433             | 1      | ,486   | ,084           | 18                       | 17                    |
| 19 | 9,100             | 1      | ,457   | ,084           | 19                       | 16                    |
| 20 | 9,133             | 1      | ,429   | ,084           | 20                       | 15                    |
| 21 | 9,200             | 1      | ,400   | ,083           | 21                       | 14                    |
| 22 | 9,233             | 1      | ,371   | ,082           | 22                       | 13                    |
| 23 | 9,633             | 1      | ,343   | ,080           | 23                       | 12                    |
| 24 | 11,267            | 1      | ,314   | ,078           | 24                       | 11                    |
| 25 | 12,167            | 1      | ,286   | ,076           | 25                       | 10                    |
| 26 | 12,300            | 1      | ,257   | ,074           | 26                       | 9                     |
| 27 | 13,167            | 1      | ,229   | ,071           | 27                       | 8                     |
| 28 | 13,400            | 1      | ,200   | ,068           | 28                       | 7                     |
| 29 | 15,200            | 1      | ,171   | ,064           | 29                       | 6                     |
| 30 | 16,833            | 1      | ,143   | ,059           | 30                       | 5                     |
| 31 | 17,567            | 1      | ,114   | ,054           | 31                       | 4                     |
| 32 | 18,600            | 1      | ,086   | ,047           | 32                       | 3                     |
| 33 | 19,033            | 1      | ,057   | ,039           | 33                       | 2                     |
| 34 | 22,400            | 1      | ,029   | ,028           | 34                       | 1                     |
| 35 | 24,267            | 1      | ,000   | ,000           | 35                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Edad

| Edad      | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|-----------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|           |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| < 65 años | 1              | 1      | ,962   | ,038           | 1                        | 25                    |
|           | 2              | 1      | ,923   | ,052           | 2                        | 24                    |
|           | 3              | 1      | ,885   | ,063           | 3                        | 23                    |
|           | 4              | 1      | ,846   | ,071           | 4                        | 22                    |
|           | 5              | 1      | ,808   | ,077           | 5                        | 21                    |
|           | 6              | 1      | ,769   | ,083           | 6                        | 20                    |
|           | 7              | 1      | ,731   | ,087           | 7                        | 19                    |
|           | 8              | 1      | ,692   | ,091           | 8                        | 18                    |
|           | 9              | 1      | ,654   | ,093           | 9                        | 17                    |
|           | 10             | 1      | ,615   | ,095           | 10                       | 16                    |
|           | 11             | 1      | ,577   | ,097           | 11                       | 15                    |
|           | 12             | 1      | ,538   | ,098           | 12                       | 14                    |
|           | 13             | 1      | ,500   | ,098           | 13                       | 13                    |
|           | 14             | 1      | ,462   | ,098           | 14                       | 12                    |
|           | 15             | 0      | .  | .              | 14                       | 11                    |
|           | 16             | 0      | .  | .              | 14                       | 10                    |
|           | 17             | 0      | .  | .              | 14                       | 9                     |
|           | 18             | 0      | .  | .              | 14                       | 8                     |
|           | 19             | 0      | .  | .              | 14                       | 7                     |
|           | 20             | 0      | .  | .              | 14                       | 6                     |
|           | 21             | 0      | .  | .              | 14                       | 5                     |
|           | 22             | 0      | .  | .              | 14                       | 4                     |
|           | 23             | 0      | .  | .              | 14                       | 3                     |
|           | 24             | 0      | .  | .              | 14                       | 2                     |
|           | 25             | 0      | .  | .              | 14                       | 1                     |
|           | 26             | 0      | .  | .              | 14                       | 0                     |
| > 65 años | 1              | 1      | ,964   | ,035           | 1                        | 27                    |
|           | 2              | 1      | ,929   | ,049           | 2                        | 26                    |
|           | 3              | 1      | ,893   | ,058           | 3                        | 25                    |
|           | 4              | 1      | ,857   | ,066           | 4                        | 24                    |
|           | 5              | 1      | ,821   | ,072           | 5                        | 23                    |
|           | 6              | 1      | ,786   | ,078           | 6                        | 22                    |
|           | 7              | 1      | ,750   | ,082           | 7                        | 21                    |
|           | 8              | 1      | ,714   | ,085           | 8                        | 20                    |
|           | 9              | 1      | ,679   | ,088           | 9                        | 19                    |
|           | 10             | 1      | ,643   | ,091           | 10                       | 18                    |
|           | 11             | 1      | ,607   | ,092           | 11                       | 17                    |
|           | 12             | 1      | ,571   | ,094           | 12                       | 16                    |
|           | 13             | 1      | ,536   | ,094           | 13                       | 15                    |
|           | 14             | 1      | ,500   | ,094           | 14                       | 14                    |
|           | 15             | 1      | ,464   | ,094           | 15                       | 13                    |
|           | 16             | 1      | ,429   | ,094           | 16                       | 12                    |
|           | 17             | 1      | ,393   | ,092           | 17                       | 11                    |
|           | 18             | 1      | ,357   | ,091           | 18                       | 10                    |
|           | 19             | 1      | ,321   | ,088           | 19                       | 9                     |
|           | 20             | 1      | ,286   | ,085           | 20                       | 8                     |
|           | 21             | 1      | ,250   | ,082           | 21                       | 7                     |
|           | 22             | 0      | .  | .              | 21                       | 6                     |
|           | 23             | 0      | .  | .              | 21                       | 5                     |
|           | 24             | 0      | .  | .              | 21                       | 4                     |
|           | 25             | 0      | .  | .              | 21                       | 3                     |
|           | 26             | 0      | .  | .              | 21                       | 2                     |
|           | 27             | 0      | .  | .              | 21                       | 1                     |
|           | 28             | 0      | .  | .              | 21                       | 0                     |

Tabla Supervivencia. Tamaño del tumor

| Tamaño del tumor |    | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|------------------|----|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|                  |    |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| <6 cm            | 1  | 2,533          | 1      | ,968   | ,032           | 1                        | 30                    |
|                  | 2  | 2,800          | 1      | ,935   | ,044           | 2                        | 29                    |
|                  | 3  | 3,133          | 1      | ,903   | ,053           | 3                        | 28                    |
|                  | 4  | 3,633          | 1      | ,871   | ,060           | 4                        | 27                    |
|                  | 5  | 4,600          | 1      | ,839   | ,066           | 5                        | 26                    |
|                  | 6  | 6,767          | 1      | ,806   | ,071           | 6                        | 25                    |
|                  | 7  | 8,400          | 1      | ,774   | ,075           | 7                        | 24                    |
|                  | 8  | 8,433          | 1      | ,742   | ,079           | 8                        | 23                    |
|                  | 9  | 9,133          | 1      | ,710   | ,082           | 9                        | 22                    |
|                  | 10 | 9,233          | 1      | ,677   | ,084           | 10                       | 21                    |
|                  | 11 | 12,167         | 1      | ,645   | ,086           | 11                       | 20                    |
|                  | 12 | 12,300         | 1      | ,613   | ,087           | 12                       | 19                    |
|                  | 13 | 16,833         | 1      | ,581   | ,089           | 13                       | 18                    |
|                  | 14 | 22,400         | 1      | ,548   | ,089           | 14                       | 17                    |
|                  | 15 | 24,267         | 1      | ,516   | ,090           | 15                       | 16                    |
|                  | 16 | 24,333         | 0      | .  | .              | 15                       | 15                    |
|                  | 17 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 14                    |
|                  | 18 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 13                    |
|                  | 19 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 12                    |
|                  | 20 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 11                    |
|                  | 21 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 10                    |
|                  | 22 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 9                     |
|                  | 23 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 8                     |
|                  | 24 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 7                     |
|                  | 25 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 6                     |
|                  | 26 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 5                     |
|                  | 27 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 4                     |
|                  | 28 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 3                     |
|                  | 29 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 2                     |
|                  | 30 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 1                     |
|                  | 31 | 24,367         | 0      | .  | .              | 15                       | 0                     |
| > 6cm            | 1  | 1,567          | 1      | ,941   | ,057           | 1                        | 16                    |
|                  | 2  | 1,933          | 1      | ,882   | ,078           | 2                        | 15                    |
|                  | 3  | 2,267          | 1      | ,824   | ,092           | 3                        | 14                    |
|                  | 4  | 2,733          | 1      | ,765   | ,103           | 4                        | 13                    |
|                  | 5  | 5,000          | 1      | ,706   | ,111           | 5                        | 12                    |
|                  | 6  | 6,533          | 1      | ,647   | ,116           | 6                        | 11                    |
|                  | 7  | 8,100          | 1      | ,588   | ,119           | 7                        | 10                    |
|                  | 8  | 9,100          | 1      | ,529   | ,121           | 8                        | 9                     |
|                  | 9  | 9,633          | 1      | ,471   | ,121           | 9                        | 8                     |
|                  | 10 | 11,267         | 1      | ,412   | ,119           | 10                       | 7                     |
|                  | 11 | 13,167         | 1      | ,353   | ,116           | 11                       | 6                     |
|                  | 12 | 13,400         | 1      | ,294   | ,111           | 12                       | 5                     |
|                  | 13 | 15,200         | 1      | ,235   | ,103           | 13                       | 4                     |
|                  | 14 | 18,600         | 1      | ,176   | ,092           | 14                       | 3                     |
|                  | 15 | 19,033         | 1      | ,118   | ,078           | 15                       | 2                     |
|                  | 16 | 24,333         | 0      | .  | .              | 15                       | 1                     |
|                  | 17 | 24,333         | 0      | .  | .              | 15                       | 0                     |



Tabla supervivencia. Estirpe Histológica

| Estirpe Histológica | Tiempo (meses) | Estado | Proporción acumulada de supervivencia en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|---------------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|                     |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| Adenocarcinoma      | 1              | 1      | ,923   | ,074           | 1                        | 12                    |
|                     | 2              | 1      | ,846   | ,100           | 2                        | 11                    |
|                     | 3              | 1      | ,769   | ,117           | 3                        | 10                    |
|                     | 4              | 1      | ,692   | ,128           | 4                        | 9                     |
|                     | 5              | 1      | ,615   | ,135           | 5                        | 8                     |
|                     | 6              | 1      | ,538   | ,138           | 6                        | 7                     |
|                     | 7              | 1      | ,462   | ,138           | 7                        | 6                     |
|                     | 8              | 1      | ,385   | ,135           | 8                        | 5                     |
|                     | 9              | 1      | ,308   | ,128           | 9                        | 4                     |
|                     | 10             | 0      | .  | .              | 9                        | 3                     |
|                     | 11             | 0      | .  | .              | 9                        | 2                     |
|                     | 12             | 0      | .  | .              | 9                        | 1                     |
|                     | 13             | 0      | .  | .              | 9                        | 0                     |
| Epidermoide         | 1              | 1      | ,958   | ,041           | 1                        | 23                    |
|                     | 2              | 1      | ,917   | ,056           | 2                        | 22                    |
|                     | 3              | 1      | ,875   | ,068           | 3                        | 21                    |
|                     | 4              | 1      | ,833   | ,076           | 4                        | 20                    |
|                     | 5              | 1      | ,792   | ,083           | 5                        | 19                    |
|                     | 6              | 1      | ,750   | ,088           | 6                        | 18                    |
|                     | 7              | 1      | ,708   | ,093           | 7                        | 17                    |
|                     | 8              | 1      | ,667   | ,096           | 8                        | 16                    |
|                     | 9              | 1      | ,625   | ,099           | 9                        | 15                    |
|                     | 10             | 1      | ,583   | ,101           | 10                       | 14                    |
|                     | 11             | 1      | ,542   | ,102           | 11                       | 13                    |
|                     | 12             | 1      | ,500   | ,102           | 12                       | 12                    |
|                     | 13             | 1      | ,458   | ,102           | 13                       | 11                    |
|                     | 14             | 1      | ,417   | ,101           | 14                       | 10                    |
|                     | 15             | 0      | .  | .              | 14                       | 9                     |
|                     | 16             | 0      | .  | .              | 14                       | 8                     |
|                     | 17             | 0      | .  | .              | 14                       | 7                     |
|                     | 18             | 0      | .  | .              | 14                       | 6                     |
|                     | 19             | 0      | .  | .              | 14                       | 5                     |
|                     | 20             | 0      | .  | .              | 14                       | 4                     |
|                     | 21             | 0      | .  | .              | 14                       | 3                     |
|                     | 22             | 0      | .  | .              | 14                       | 2                     |
|                     | 23             | 0      | .  | .              | 14                       | 1                     |
|                     | 24             | 0      | .  | .              | 14                       | 0                     |
| C Grandes           | 1              | 1      | ,875   | ,117           | 1                        | 7                     |
|                     | 2              | 1      | ,750   | ,153           | 2                        | 6                     |
|                     | 3              | 1      | ,625   | ,171           | 3                        | 5                     |
|                     | 4              | 1      | ,500   | ,177           | 4                        | 4                     |
|                     | 5              | 1      | ,375   | ,171           | 5                        | 3                     |
|                     | 6              | 0      | .  | .              | 5                        | 2                     |
|                     | 7              | 0      | .  | .              | 5                        | 1                     |
|                     | 8              | 0      | .  | .              | 5                        | 0                     |
| C. Pequeñas         | 1              | 1      | ,889   | ,105           | 1                        | 8                     |
|                     | 2              | 1      | ,778   | ,139           | 2                        | 7                     |
|                     | 3              | 1      | ,667   | ,157           | 3                        | 6                     |
|                     | 4              | 1      | ,556   | ,166           | 4                        | 5                     |
|                     | 5              | 1      | ,444   | ,166           | 5                        | 4                     |
|                     | 6              | 1      | ,333   | ,157           | 6                        | 3                     |
|                     | 7              | 1      | ,222   | ,139           | 7                        | 2                     |
|                     | 8              | 0      | .  | .              | 7                        | 1                     |
|                     | 9              | 0      | .  | .              | 7                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Clasificación TNM

| Clasificación TNM | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |    |
|-------------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|----|
|                   |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |    |
| Estadio I         | 1              | 17,567 | 1  | ,917           | ,080                     | 1                     | 11 |
|                   | 2              | 24,267 | 1  | ,833           | ,108                     | 2                     | 10 |
|                   | 3              | 24,333 | 0  | .              | .                        | 2                     | 9  |
|                   | 4              | 24,333 | 0  | .              | .                        | 2                     | 8  |
|                   | 5              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 2                     | 7  |
|                   | 6              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 2                     | 6  |
|                   | 7              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 2                     | 5  |
|                   | 8              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 2                     | 4  |
|                   | 9              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 2                     | 3  |
|                   | 10             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 2                     | 2  |
|                   | 11             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 2                     | 1  |
|                   | 12             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 2                     | 0  |
| Estadio II        | 1              | 24,333 | 0  | .              | .                        | 0                     | 4  |
|                   | 2              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 0                     | 3  |
|                   | 3              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 0                     | 2  |
|                   | 4              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 0                     | 1  |
|                   | 5              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 0                     | 0  |
| Estadio III       | 1              | 1,567  | 1  | ,955           | ,044                     | 1                     | 21 |
|                   | 2              | 1,933  | 1  | ,909           | ,061                     | 2                     | 20 |
|                   | 3              | 2,267  | 1  | ,864           | ,073                     | 3                     | 19 |
|                   | 4              | 2,800  | 1  | ,818           | ,082                     | 4                     | 18 |
|                   | 5              | 4,300  | 1  | ,773           | ,089                     | 5                     | 17 |
|                   | 6              | 5,000  | 1  | ,727           | ,095                     | 6                     | 16 |
|                   | 7              | 6,533  | 1  | ,682           | ,099                     | 7                     | 15 |
|                   | 8              | 8,400  | 1  | ,636           | ,103                     | 8                     | 14 |
|                   | 9              | 9,100  | 1  | ,591           | ,105                     | 9                     | 13 |
|                   | 10             | 9,200  | 1  | ,545           | ,106                     | 10                    | 12 |
|                   | 11             | 9,233  | 1  | ,500           | ,107                     | 11                    | 11 |
|                   | 12             | 11,267 | 1  | ,455           | ,106                     | 12                    | 10 |
|                   | 13             | 12,300 | 1  | ,409           | ,105                     | 13                    | 9  |
|                   | 14             | 13,400 | 1  | ,364           | ,103                     | 14                    | 8  |
|                   | 15             | 15,200 | 1  | ,318           | ,099                     | 15                    | 7  |
|                   | 16             | 16,833 | 1  | ,273           | ,095                     | 16                    | 6  |
|                   | 17             | 18,600 | 1  | ,227           | ,089                     | 17                    | 5  |
|                   | 18             | 22,400 | 1  | ,182           | ,082                     | 18                    | 4  |
|                   | 19             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 18                    | 3  |
|                   | 20             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 18                    | 2  |
|                   | 21             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 18                    | 1  |
|                   | 22             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 18                    | 0  |
| Estadio IV        | 1              | 2,533  | 1  | ,933           | ,064                     | 1                     | 14 |
|                   | 2              | 2,733  | 1  | ,867           | ,088                     | 2                     | 13 |
|                   | 3              | 3,133  | 1  | ,800           | ,103                     | 3                     | 12 |
|                   | 4              | 3,633  | 1  | ,733           | ,114                     | 4                     | 11 |
|                   | 5              | 4,600  | 1  | ,667           | ,122                     | 5                     | 10 |
|                   | 6              | 6,633  | 1  | ,600           | ,126                     | 6                     | 9  |
|                   | 7              | 6,767  | 1  | ,533           | ,129                     | 7                     | 8  |
|                   | 8              | 7,300  | 1  | ,467           | ,129                     | 8                     | 7  |
|                   | 9              | 8,100  | 1  | ,400           | ,126                     | 9                     | 6  |
|                   | 10             | 8,433  | 1  | ,333           | ,122                     | 10                    | 5  |
|                   | 11             | 9,133  | 1  | ,267           | ,114                     | 11                    | 4  |
|                   | 12             | 9,633  | 1  | ,200           | ,103                     | 12                    | 3  |
|                   | 13             | 12,167 | 1  | ,133           | ,088                     | 13                    | 2  |
|                   | 14             | 13,167 | 1  | ,067           | ,064                     | 14                    | 1  |
|                   | 15             | 19,033 | 1  | ,000           | ,000                     | 15                    | 0  |

**Tablas de supervivencia según la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral**

**Tabla supervivencia. Expresión VEGF-A**

| VEGF-A | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,944   | ,054           | 1                        | 17                    |
|        | 2              | 1      | ,889   | ,074           | 2                        | 16                    |
|        | 3              | 1      | ,833   | ,088           | 3                        | 15                    |
|        | 4              | 1      | ,778   | ,098           | 4                        | 14                    |
|        | 5              | 1      | ,722   | ,106           | 5                        | 13                    |
|        | 6              | 1      | ,667   | ,111           | 6                        | 12                    |
|        | 7              | 1      | ,611   | ,115           | 7                        | 11                    |
|        | 8              | 1      | ,556   | ,117           | 8                        | 10                    |
|        | 9              | 1      | ,500   | ,118           | 9                        | 9                     |
|        | 10             | 1      | ,444   | ,117           | 10                       | 8                     |
|        | 11             | 1      | ,389   | ,115           | 11                       | 7                     |
|        | 12             | 1      | ,333   | ,111           | 12                       | 6                     |
|        | 13             | 0      | .  | .              | 12                       | 5                     |
|        | 14             | 0      | .  | .              | 12                       | 4                     |
|        | 15             | 0      | .  | .              | 12                       | 3                     |
|        | 16             | 0      | .  | .              | 12                       | 2                     |
|        | 17             | 0      | .  | .              | 12                       | 1                     |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 12                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,972   | ,027           | 1                        | 35                    |
|        | 2              | 1      | ,944   | ,038           | 2                        | 34                    |
|        | 3              | 1      | ,917   | ,046           | 3                        | 33                    |
|        | 4              | 1      | ,889   | ,052           | 4                        | 32                    |
|        | 5              | 1      | ,861   | ,058           | 5                        | 31                    |
|        | 6              | 1      | ,833   | ,062           | 6                        | 30                    |
|        | 7              | 1      | ,806   | ,066           | 7                        | 29                    |
|        | 8              | 1      | ,778   | ,069           | 8                        | 28                    |
|        | 9              | 1      | ,750   | ,072           | 9                        | 27                    |
|        | 10             | 1      | ,722   | ,075           | 10                       | 26                    |
|        | 11             | 1      | ,694   | ,077           | 11                       | 25                    |
|        | 12             | 1      | ,667   | ,079           | 12                       | 24                    |
|        | 13             | 1      | ,639   | ,080           | 13                       | 23                    |
|        | 14             | 1      | ,611   | ,081           | 14                       | 22                    |
|        | 15             | 1      | ,583   | ,082           | 15                       | 21                    |
|        | 16             | 1      | ,556   | ,083           | 16                       | 20                    |
|        | 17             | 1      | ,528   | ,083           | 17                       | 19                    |
|        | 18             | 1      | ,500   | ,083           | 18                       | 18                    |
|        | 19             | 1      | ,472   | ,083           | 19                       | 17                    |
|        | 20             | 1      | ,444   | ,083           | 20                       | 16                    |
|        | 21             | 1      | ,417   | ,082           | 21                       | 15                    |
|        | 22             | 1      | ,389   | ,081           | 22                       | 14                    |
|        | 23             | 1      | ,361   | ,080           | 23                       | 13                    |
|        | 24             | 0      | .  | .              | 23                       | 12                    |
|        | 25             | 0      | .  | .              | 23                       | 11                    |
|        | 26             | 0      | .  | .              | 23                       | 10                    |
|        | 27             | 0      | .  | .              | 23                       | 9                     |
|        | 28             | 0      | .  | .              | 23                       | 8                     |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 23                       | 7                     |
|        | 30             | 0      | .  | .              | 23                       | 6                     |
|        | 31             | 0      | .  | .              | 23                       | 5                     |
|        | 32             | 0      | .  | .              | 23                       | 4                     |
|        | 33             | 0      | .  | .              | 23                       | 3                     |
|        | 34             | 0      | .  | .              | 23                       | 2                     |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 23                       | 1                     |
|        | 36             | 0      | .  | .              | 23                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGF-B

| VEGF-B | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,969   | ,031           | 1                        | 31                    |
|        | 2              | 1      | ,938   | ,043           | 2                        | 30                    |
|        | 3              | 1      | ,906   | ,052           | 3                        | 29                    |
|        | 4              | 1      | ,875   | ,058           | 4                        | 28                    |
|        | 5              | 1      | ,844   | ,064           | 5                        | 27                    |
|        | 6              | 1      | ,813   | ,069           | 6                        | 26                    |
|        | 7              | 1      | ,781   | ,073           | 7                        | 25                    |
|        | 8              | 1      | ,750   | ,077           | 8                        | 24                    |
|        | 9              | 1      | ,719   | ,079           | 9                        | 23                    |
|        | 10             | 1      | ,688   | ,082           | 10                       | 22                    |
|        | 11             | 1      | ,656   | ,084           | 11                       | 21                    |
|        | 12             | 1      | ,625   | ,086           | 12                       | 20                    |
|        | 13             | 1      | ,594   | ,087           | 13                       | 19                    |
|        | 14             | 1      | ,563   | ,088           | 14                       | 18                    |
|        | 15             | 1      | ,531   | ,088           | 15                       | 17                    |
|        | 16             | 1      | ,500   | ,088           | 16                       | 16                    |
|        | 17             | 1      | ,469   | ,088           | 17                       | 15                    |
|        | 18             | 1      | ,438   | ,088           | 18                       | 14                    |
|        | 19             | 1      | ,406   | ,087           | 19                       | 13                    |
|        | 20             | 1      | ,375   | ,086           | 20                       | 12                    |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 20                       | 11                    |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 20                       | 10                    |
|        | 23             | 0      | .  | .              | 20                       | 9                     |
|        | 24             | 0      | .  | .              | 20                       | 8                     |
|        | 25             | 0      | .  | .              | 20                       | 7                     |
|        | 26             | 0      | .  | .              | 20                       | 6                     |
|        | 27             | 0      | .  | .              | 20                       | 5                     |
|        | 28             | 0      | .  | .              | 20                       | 4                     |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 20                       | 3                     |
|        | 30             | 0      | .  | .              | 20                       | 2                     |
|        | 31             | 0      | .  | .              | 20                       | 1                     |
|        | 32             | 0      | .  | .              | 20                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,955   | ,044           | 1                        | 21                    |
|        | 2              | 1      | ,909   | ,061           | 2                        | 20                    |
|        | 3              | 1      | ,864   | ,073           | 3                        | 19                    |
|        | 4              | 1      | ,818   | ,082           | 4                        | 18                    |
|        | 5              | 1      | ,773   | ,089           | 5                        | 17                    |
|        | 6              | 1      | ,727   | ,095           | 6                        | 16                    |
|        | 7              | 1      | ,682   | ,099           | 7                        | 15                    |
|        | 8              | 1      | ,636   | ,103           | 8                        | 14                    |
|        | 9              | 1      | ,591   | ,105           | 9                        | 13                    |
|        | 10             | 1      | ,545   | ,106           | 10                       | 12                    |
|        | 11             | 1      | ,500   | ,107           | 11                       | 11                    |
|        | 12             | 1      | ,455   | ,106           | 12                       | 10                    |
|        | 13             | 1      | ,409   | ,105           | 13                       | 9                     |
|        | 14             | 1      | ,364   | ,103           | 14                       | 8                     |
|        | 15             | 1      | ,318   | ,099           | 15                       | 7                     |
|        | 16             | 0      | .  | .              | 15                       | 6                     |
|        | 17             | 0      | .  | .              | 15                       | 5                     |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 15                       | 4                     |
|        | 19             | 0      | .  | .              | 15                       | 3                     |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 15                       | 2                     |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 15                       | 1                     |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 15                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGF-C

| VEGF-C | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,938   | ,061           | 1                        | 15                    |
|        | 2              | 1      | ,875   | ,083           | 2                        | 14                    |
|        | 3              | 1      | ,813   | ,098           | 3                        | 13                    |
|        | 4              | 1      | ,750   | ,108           | 4                        | 12                    |
|        | 5              | 1      | ,688   | ,116           | 5                        | 11                    |
|        | 6              | 1      | ,625   | ,121           | 6                        | 10                    |
|        | 7              | 1      | ,563   | ,124           | 7                        | 9                     |
|        | 8              | 1      | ,500   | ,125           | 8                        | 8                     |
|        | 9              | 0      | .  | .              | 8                        | 7                     |
|        | 10             | 0      | .  | .              | 8                        | 6                     |
|        | 11             | 0      | .  | .              | 8                        | 5                     |
|        | 12             | 0      | .  | .              | 8                        | 4                     |
|        | 13             | 0      | .  | .              | 8                        | 3                     |
|        | 14             | 0      | .  | .              | 8                        | 2                     |
|        | 15             | 0      | .  | .              | 8                        | 1                     |
|        | 16             | 0      | .  | .              | 8                        | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,974   | ,026           | 1                        | 37                    |
|        | 2              | 1      | ,947   | ,036           | 2                        | 36                    |
|        | 3              | 1      | ,921   | ,044           | 3                        | 35                    |
|        | 4              | 1      | ,895   | ,050           | 4                        | 34                    |
|        | 5              | 1      | ,868   | ,055           | 5                        | 33                    |
|        | 6              | 1      | ,842   | ,059           | 6                        | 32                    |
|        | 7              | 1      | ,816   | ,063           | 7                        | 31                    |
|        | 8              | 1      | ,789   | ,066           | 8                        | 30                    |
|        | 9              | 1      | ,763   | ,069           | 9                        | 29                    |
|        | 10             | 1      | ,737   | ,071           | 10                       | 28                    |
|        | 11             | 1      | ,711   | ,074           | 11                       | 27                    |
|        | 12             | 1      | ,684   | ,075           | 12                       | 26                    |
|        | 13             | 1      | ,658   | ,077           | 13                       | 25                    |
|        | 14             | 1      | ,632   | ,078           | 14                       | 24                    |
|        | 15             | 1      | ,605   | ,079           | 15                       | 23                    |
|        | 16             | 1      | ,579   | ,080           | 16                       | 22                    |
|        | 17             | 1      | ,553   | ,081           | 17                       | 21                    |
|        | 18             | 1      | ,526   | ,081           | 18                       | 20                    |
|        | 19             | 1      | ,500   | ,081           | 19                       | 19                    |
|        | 20             | 1      | ,474   | ,081           | 20                       | 18                    |
|        | 21             | 1      | ,447   | ,081           | 21                       | 17                    |
|        | 22             | 1      | ,421   | ,080           | 22                       | 16                    |
|        | 23             | 1      | ,395   | ,079           | 23                       | 15                    |
|        | 24             | 1      | ,368   | ,078           | 24                       | 14                    |
|        | 25             | 1      | ,342   | ,077           | 25                       | 13                    |
|        | 26             | 1      | ,316   | ,075           | 26                       | 12                    |
|        | 27             | 1      | ,289   | ,074           | 27                       | 11                    |
|        | 28             | 0      | .  | .              | 27                       | 10                    |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 27                       | 9                     |
|        | 30             | 0      | .  | .              | 27                       | 8                     |
|        | 31             | 0      | .  | .              | 27                       | 7                     |
|        | 32             | 0      | .  | .              | 27                       | 6                     |
|        | 33             | 0      | .  | .              | 27                       | 5                     |
|        | 34             | 0      | .  | .              | 27                       | 4                     |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 27                       | 3                     |
|        | 36             | 0      | .  | .              | 27                       | 2                     |
|        | 37             | 0      | .  | .              | 27                       | 1                     |
|        | 38             | 0      | .  | .              | 27                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGF-D

| VEGF-D | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,958   | ,041           | 1                        | 23                    |
|        | 2              | 1      | ,917   | ,056           | 2                        | 22                    |
|        | 3              | 1      | ,875   | ,068           | 3                        | 21                    |
|        | 4              | 1      | ,833   | ,076           | 4                        | 20                    |
|        | 5              | 1      | ,792   | ,083           | 5                        | 19                    |
|        | 6              | 1      | ,750   | ,088           | 6                        | 18                    |
|        | 7              | 1      | ,708   | ,093           | 7                        | 17                    |
|        | 8              | 1      | ,667   | ,096           | 8                        | 16                    |
|        | 9              | 1      | ,625   | ,099           | 9                        | 15                    |
|        | 10             | 1      | ,583   | ,101           | 10                       | 14                    |
|        | 11             | 1      | ,542   | ,102           | 11                       | 13                    |
|        | 12             | 1      | ,500   | ,102           | 12                       | 12                    |
|        | 13             | 1      | ,458   | ,102           | 13                       | 11                    |
|        | 14             | 1      | ,417   | ,101           | 14                       | 10                    |
|        | 15             | 1      | ,375   | ,099           | 15                       | 9                     |
|        | 16             | 1      | ,333   | ,096           | 16                       | 8                     |
|        | 17             | 0      | .  | .              | 16                       | 7                     |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 16                       | 6                     |
|        | 19             | 0      | .  | .              | 16                       | 5                     |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 16                       | 4                     |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 16                       | 3                     |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 16                       | 2                     |
|        | 23             | 0      | .  | .              | 16                       | 1                     |
|        | 24             | 0      | .  | .              | 16                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,967   | ,033           | 1                        | 29                    |
|        | 2              | 1      | ,933   | ,046           | 2                        | 28                    |
|        | 3              | 1      | ,900   | ,055           | 3                        | 27                    |
|        | 4              | 1      | ,867   | ,062           | 4                        | 26                    |
|        | 5              | 1      | ,833   | ,068           | 5                        | 25                    |
|        | 6              | 1      | ,800   | ,073           | 6                        | 24                    |
|        | 7              | 1      | ,767   | ,077           | 7                        | 23                    |
|        | 8              | 1      | ,733   | ,081           | 8                        | 22                    |
|        | 9              | 1      | ,700   | ,084           | 9                        | 21                    |
|        | 10             | 1      | ,667   | ,086           | 10                       | 20                    |
|        | 11             | 1      | ,633   | ,088           | 11                       | 19                    |
|        | 12             | 1      | ,600   | ,089           | 12                       | 18                    |
|        | 13             | 1      | ,567   | ,090           | 13                       | 17                    |
|        | 14             | 1      | ,533   | ,091           | 14                       | 16                    |
|        | 15             | 1      | ,500   | ,091           | 15                       | 15                    |
|        | 16             | 1      | ,467   | ,091           | 16                       | 14                    |
|        | 17             | 1      | ,433   | ,090           | 17                       | 13                    |
|        | 18             | 1      | ,400   | ,089           | 18                       | 12                    |
|        | 19             | 1      | ,367   | ,088           | 19                       | 11                    |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 19                       | 10                    |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 19                       | 9                     |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 19                       | 8                     |
|        | 23             | 0      | .  | .              | 19                       | 7                     |
|        | 24             | 0      | .  | .              | 19                       | 6                     |
|        | 25             | 0      | .  | .              | 19                       | 5                     |
|        | 26             | 0      | .  | .              | 19                       | 4                     |
|        | 27             | 0      | .  | .              | 19                       | 3                     |
|        | 28             | 0      | .  | .              | 19                       | 2                     |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 19                       | 1                     |
|        | 30             | 0      | .  | .              | 19                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGFR1

| VEGFR1 | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,917   | ,080           | 1                        | 11                    |
|        | 2              | 1      | ,833   | ,108           | 2                        | 10                    |
|        | 3              | 1      | ,750   | ,125           | 3                        | 9                     |
|        | 4              | 1      | ,667   | ,136           | 4                        | 8                     |
|        | 5              | 1      | ,583   | ,142           | 5                        | 7                     |
|        | 6              | 1      | ,500   | ,144           | 6                        | 6                     |
|        | 7              | 1      | ,417   | ,142           | 7                        | 5                     |
|        | 8              | 1      | ,333   | ,136           | 8                        | 4                     |
|        | 9              | 0      | .  | .              | 8                        | 3                     |
|        | 10             | 0      | .  | .              | 8                        | 2                     |
|        | 11             | 0      | .  | .              | 8                        | 1                     |
|        | 12             | 0      | .  | .              | 8                        | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,976   | ,024           | 1                        | 41                    |
|        | 2              | 1      | ,952   | ,033           | 2                        | 40                    |
|        | 3              | 1      | ,929   | ,040           | 3                        | 39                    |
|        | 4              | 1      | ,905   | ,045           | 4                        | 38                    |
|        | 5              | 1      | ,881   | ,050           | 5                        | 37                    |
|        | 6              | 1      | ,857   | ,054           | 6                        | 36                    |
|        | 7              | 1      | ,833   | ,058           | 7                        | 35                    |
|        | 8              | 1      | ,810   | ,061           | 8                        | 34                    |
|        | 9              | 1      | ,786   | ,063           | 9                        | 33                    |
|        | 10             | 1      | ,762   | ,066           | 10                       | 32                    |
|        | 11             | 1      | ,738   | ,068           | 11                       | 31                    |
|        | 12             | 1      | ,714   | ,070           | 12                       | 30                    |
|        | 13             | 1      | ,690   | ,071           | 13                       | 29                    |
|        | 14             | 1      | ,667   | ,073           | 14                       | 28                    |
|        | 15             | 1      | ,643   | ,074           | 15                       | 27                    |
|        | 16             | 1      | ,619   | ,075           | 16                       | 26                    |
|        | 17             | 1      | ,595   | ,076           | 17                       | 25                    |
|        | 18             | 1      | ,571   | ,076           | 18                       | 24                    |
|        | 19             | 1      | ,548   | ,077           | 19                       | 23                    |
|        | 20             | 1      | ,524   | ,077           | 20                       | 22                    |
|        | 21             | 1      | ,500   | ,077           | 21                       | 21                    |
|        | 22             | 1      | ,476   | ,077           | 22                       | 20                    |
|        | 23             | 1      | ,452   | ,077           | 23                       | 19                    |
|        | 24             | 1      | ,429   | ,076           | 24                       | 18                    |
|        | 25             | 1      | ,405   | ,076           | 25                       | 17                    |
|        | 26             | 1      | ,381   | ,075           | 26                       | 16                    |
|        | 27             | 1      | ,357   | ,074           | 27                       | 15                    |
|        | 28             | 0      | .  | .              | 27                       | 14                    |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 27                       | 13                    |
|        | 30             | 0      | .  | .              | 27                       | 12                    |
|        | 31             | 0      | .  | .              | 27                       | 11                    |
|        | 32             | 0      | .  | .              | 27                       | 10                    |
|        | 33             | 0      | .  | .              | 27                       | 9                     |
|        | 34             | 0      | .  | .              | 27                       | 8                     |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 27                       | 7                     |
|        | 36             | 0      | .  | .              | 27                       | 6                     |
|        | 37             | 0      | .  | .              | 27                       | 5                     |
|        | 38             | 0      | .  | .              | 27                       | 4                     |
|        | 39             | 0      | .  | .              | 27                       | 3                     |
|        | 40             | 0      | .  | .              | 27                       | 2                     |
|        | 41             | 0      | .  | .              | 27                       | 1                     |
|        | 42             | 0      | .  | .              | 27                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGFR2

| VEGFR2 | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,875   | ,117           | 1                        | 7                     |
|        | 2              | 1      | ,750   | ,153           | 2                        | 6                     |
|        | 3              | 1      | ,625   | ,171           | 3                        | 5                     |
|        | 4              | 0      | .  | .              | 3                        | 4                     |
|        | 5              | 0      | .  | .              | 3                        | 3                     |
|        | 6              | 0      | .  | .              | 3                        | 2                     |
|        | 7              | 0      | .  | .              | 3                        | 1                     |
|        | 8              | 0      | .  | .              | 3                        | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,978   | ,022           | 1                        | 45                    |
|        | 2              | 1      | ,957   | ,030           | 2                        | 44                    |
|        | 3              | 1      | ,935   | ,036           | 3                        | 43                    |
|        | 4              | 1      | ,913   | ,042           | 4                        | 42                    |
|        | 5              | 1      | ,891   | ,046           | 5                        | 41                    |
|        | 6              | 1      | ,870   | ,050           | 6                        | 40                    |
|        | 7              | 1      | ,848   | ,053           | 7                        | 39                    |
|        | 8              | 1      | ,826   | ,056           | 8                        | 38                    |
|        | 9              | 1      | ,804   | ,058           | 9                        | 37                    |
|        | 10             | 1      | ,783   | ,061           | 10                       | 36                    |
|        | 11             | 1      | ,761   | ,063           | 11                       | 35                    |
|        | 12             | 1      | ,739   | ,065           | 12                       | 34                    |
|        | 13             | 1      | ,717   | ,066           | 13                       | 33                    |
|        | 14             | 1      | ,696   | ,068           | 14                       | 32                    |
|        | 15             | 1      | ,674   | ,069           | 15                       | 31                    |
|        | 16             | 1      | ,652   | ,070           | 16                       | 30                    |
|        | 17             | 1      | ,630   | ,071           | 17                       | 29                    |
|        | 18             | 1      | ,609   | ,072           | 18                       | 28                    |
|        | 19             | 1      | ,587   | ,073           | 19                       | 27                    |
|        | 20             | 1      | ,565   | ,073           | 20                       | 26                    |
|        | 21             | 1      | ,543   | ,073           | 21                       | 25                    |
|        | 22             | 1      | ,522   | ,074           | 22                       | 24                    |
|        | 23             | 1      | ,500   | ,074           | 23                       | 23                    |
|        | 24             | 1      | ,478   | ,074           | 24                       | 22                    |
|        | 25             | 1      | ,457   | ,073           | 25                       | 21                    |
|        | 26             | 1      | ,435   | ,073           | 26                       | 20                    |
|        | 27             | 1      | ,413   | ,073           | 27                       | 19                    |
|        | 28             | 1      | ,391   | ,072           | 28                       | 18                    |
|        | 29             | 1      | ,370   | ,071           | 29                       | 17                    |
|        | 30             | 1      | ,348   | ,070           | 30                       | 16                    |
|        | 31             | 1      | ,326   | ,069           | 31                       | 15                    |
|        | 32             | 1      | ,304   | ,068           | 32                       | 14                    |
|        | 33             | 0      | .  | .              | 32                       | 13                    |
|        | 34             | 0      | .  | .              | 32                       | 12                    |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 32                       | 11                    |
|        | 36             | 0      | .  | .              | 32                       | 10                    |
|        | 37             | 0      | .  | .              | 32                       | 9                     |
|        | 38             | 0      | .  | .              | 32                       | 8                     |
|        | 39             | 0      | .  | .              | 32                       | 7                     |
|        | 40             | 0      | .  | .              | 32                       | 6                     |
|        | 41             | 0      | .  | .              | 32                       | 5                     |
|        | 42             | 0      | .  | .              | 32                       | 4                     |
|        | 43             | 0      | .  | .              | 32                       | 3                     |
|        | 44             | 0      | .  | .              | 32                       | 2                     |
|        | 45             | 0      | .  | .              | 32                       | 1                     |
|        | 46             | 0      | .  | .              | 32                       | 0                     |



Tabla supervivencia. Expresión VEGFR3

| VEGFR3 | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,909   | ,087           | 1                        | 10                    |
|        | 2              | 1      | ,818   | ,116           | 2                        | 9                     |
|        | 3              | 1      | ,727   | ,134           | 3                        | 8                     |
|        | 4              | 1      | ,636   | ,145           | 4                        | 7                     |
|        | 5              | 1      | ,545   | ,150           | 5                        | 6                     |
|        | 6              | 1      | ,455   | ,150           | 6                        | 5                     |
|        | 7              | 1      | ,364   | ,145           | 7                        | 4                     |
|        | 8              | 0      | .  | .              | 7                        | 3                     |
|        | 9              | 0      | .  | .              | 7                        | 2                     |
|        | 10             | 0      | .  | .              | 7                        | 1                     |
|        | 11             | 0      | .  | .              | 7                        | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,977   | ,023           | 1                        | 42                    |
|        | 2              | 1      | ,953   | ,032           | 2                        | 41                    |
|        | 3              | 1      | ,930   | ,039           | 3                        | 40                    |
|        | 4              | 1      | ,907   | ,044           | 4                        | 39                    |
|        | 5              | 1      | ,884   | ,049           | 5                        | 38                    |
|        | 6              | 1      | ,860   | ,053           | 6                        | 37                    |
|        | 7              | 1      | ,837   | ,056           | 7                        | 36                    |
|        | 8              | 1      | ,814   | ,059           | 8                        | 35                    |
|        | 9              | 1      | ,791   | ,062           | 9                        | 34                    |
|        | 10             | 1      | ,767   | ,064           | 10                       | 33                    |
|        | 11             | 1      | ,744   | ,067           | 11                       | 32                    |
|        | 12             | 1      | ,721   | ,068           | 12                       | 31                    |
|        | 13             | 1      | ,698   | ,070           | 13                       | 30                    |
|        | 14             | 1      | ,674   | ,071           | 14                       | 29                    |
|        | 15             | 1      | ,651   | ,073           | 15                       | 28                    |
|        | 16             | 1      | ,628   | ,074           | 16                       | 27                    |
|        | 17             | 1      | ,605   | ,075           | 17                       | 26                    |
|        | 18             | 1      | ,581   | ,075           | 18                       | 25                    |
|        | 19             | 1      | ,558   | ,076           | 19                       | 24                    |
|        | 20             | 1      | ,535   | ,076           | 20                       | 23                    |
|        | 21             | 1      | ,512   | ,076           | 21                       | 22                    |
|        | 22             | 1      | ,488   | ,076           | 22                       | 21                    |
|        | 23             | 1      | ,465   | ,076           | 23                       | 20                    |
|        | 24             | 1      | ,442   | ,076           | 24                       | 19                    |
|        | 25             | 1      | ,419   | ,075           | 25                       | 18                    |
|        | 26             | 1      | ,395   | ,075           | 26                       | 17                    |
|        | 27             | 1      | ,372   | ,074           | 27                       | 16                    |
|        | 28             | 1      | ,349   | ,073           | 28                       | 15                    |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 28                       | 14                    |
|        | 30             | 0      | .  | .              | 28                       | 13                    |
|        | 31             | 0      | .  | .              | 28                       | 12                    |
|        | 32             | 0      | .  | .              | 28                       | 11                    |
|        | 33             | 0      | .  | .              | 28                       | 10                    |
|        | 34             | 0      | .  | .              | 28                       | 9                     |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 28                       | 8                     |
|        | 36             | 0      | .  | .              | 28                       | 7                     |
|        | 37             | 0      | .  | .              | 28                       | 6                     |
|        | 38             | 0      | .  | .              | 28                       | 5                     |
|        | 39             | 0      | .  | .              | 28                       | 4                     |
|        | 40             | 0      | .  | .              | 28                       | 3                     |
|        | 41             | 0      | .  | .              | 28                       | 2                     |
|        | 42             | 0      | .  | .              | 28                       | 1                     |
|        | 43             | 0      | .  | .              | 28                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGFR3 nuclear

| VEGFR3 nuclear | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|----------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|                |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No             | 1              | 1      | ,970   | ,030           | 1                        | 32                    |
|                | 2              | 1      | ,939   | ,042           | 2                        | 31                    |
|                | 3              | 1      | ,909   | ,050           | 3                        | 30                    |
|                | 4              | 1      | ,879   | ,057           | 4                        | 29                    |
|                | 5              | 1      | ,848   | ,062           | 5                        | 28                    |
|                | 6              | 1      | ,818   | ,067           | 6                        | 27                    |
|                | 7              | 1      | ,788   | ,071           | 7                        | 26                    |
|                | 8              | 1      | ,758   | ,075           | 8                        | 25                    |
|                | 9              | 1      | ,727   | ,078           | 9                        | 24                    |
|                | 10             | 1      | ,697   | ,080           | 10                       | 23                    |
|                | 11             | 1      | ,667   | ,082           | 11                       | 22                    |
|                | 12             | 1      | ,636   | ,084           | 12                       | 21                    |
|                | 13             | 1      | ,606   | ,085           | 13                       | 20                    |
|                | 14             | 1      | ,576   | ,086           | 14                       | 19                    |
|                | 15             | 1      | ,545   | ,087           | 15                       | 18                    |
|                | 16             | 1      | ,515   | ,087           | 16                       | 17                    |
|                | 17             | 1      | ,485   | ,087           | 17                       | 16                    |
|                | 18             | 1      | ,455   | ,087           | 18                       | 15                    |
|                | 19             | 1      | ,424   | ,086           | 19                       | 14                    |
|                | 20             | 1      | ,394   | ,085           | 20                       | 13                    |
|                | 21             | 1      | ,364   | ,084           | 21                       | 12                    |
|                | 22             | 1      | ,333   | ,082           | 22                       | 11                    |
|                | 23             | 1      | ,303   | ,080           | 23                       | 10                    |
|                | 24             | 1      | ,273   | ,078           | 24                       | 9                     |
|                | 25             | 0      | .  | .              | 24                       | 8                     |
|                | 26             | 0      | .  | .              | 24                       | 7                     |
|                | 27             | 0      | .  | .              | 24                       | 6                     |
|                | 28             | 0      | .  | .              | 24                       | 5                     |
|                | 29             | 0      | .  | .              | 24                       | 4                     |
|                | 30             | 0      | .  | .              | 24                       | 3                     |
|                | 31             | 0      | .  | .              | 24                       | 2                     |
|                | 32             | 0      | .  | .              | 24                       | 1                     |
|                | 33             | 0      | .  | .              | 24                       | 0                     |
| Si             | 1              | 1      | ,950   | ,049           | 1                        | 19                    |
|                | 2              | 1      | ,900   | ,067           | 2                        | 18                    |
|                | 3              | 1      | ,850   | ,080           | 3                        | 17                    |
|                | 4              | 1      | ,800   | ,089           | 4                        | 16                    |
|                | 5              | 1      | ,750   | ,097           | 5                        | 15                    |
|                | 6              | 1      | ,700   | ,102           | 6                        | 14                    |
|                | 7              | 1      | ,650   | ,107           | 7                        | 13                    |
|                | 8              | 1      | ,600   | ,110           | 8                        | 12                    |
|                | 9              | 1      | ,550   | ,111           | 9                        | 11                    |
|                | 10             | 1      | ,500   | ,112           | 10                       | 10                    |
|                | 11             | 0      | .  | .              | 10                       | 9                     |
|                | 12             | 0      | .  | .              | 10                       | 8                     |
|                | 13             | 0      | .  | .              | 10                       | 7                     |
|                | 14             | 0      | .  | .              | 10                       | 6                     |
|                | 15             | 0      | .  | .              | 10                       | 5                     |
|                | 16             | 0      | .  | .              | 10                       | 4                     |
|                | 17             | 0      | .  | .              | 10                       | 3                     |
|                | 18             | 0      | .  | .              | 10                       | 2                     |
|                | 19             | 0      | .  | .              | 10                       | 1                     |
|                | 20             | 0      | .  | .              | 10                       | 0                     |

**Tablas de supervivencia según los niveles expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula tumoral**

**Tabla supervivencia. Niveles de expresión VEGF-A**

| VEGF-A          | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|-----------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|                 |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| Nula<br>(0)     | 1              | 1      | ,944   | ,054           | 1                        | 17                    |
|                 | 2              | 1      | ,889   | ,074           | 2                        | 16                    |
|                 | 3              | 1      | ,833   | ,088           | 3                        | 15                    |
|                 | 4              | 1      | ,778   | ,098           | 4                        | 14                    |
|                 | 5              | 1      | ,722   | ,106           | 5                        | 13                    |
|                 | 6              | 1      | ,667   | ,111           | 6                        | 12                    |
|                 | 7              | 1      | ,611   | ,115           | 7                        | 11                    |
|                 | 8              | 1      | ,556   | ,117           | 8                        | 10                    |
|                 | 9              | 1      | ,500   | ,118           | 9                        | 9                     |
|                 | 10             | 1      | ,444   | ,117           | 10                       | 8                     |
|                 | 11             | 1      | ,389   | ,115           | 11                       | 7                     |
|                 | 12             | 1      | ,333   | ,111           | 12                       | 6                     |
|                 | 13             | 0      | .  | .              | 12                       | 5                     |
|                 | 14             | 0      | .  | .              | 12                       | 4                     |
|                 | 15             | 0      | .  | .              | 12                       | 3                     |
|                 | 16             | 0      | .  | .              | 12                       | 2                     |
|                 | 17             | 0      | .  | .              | 12                       | 1                     |
|                 | 18             | 0      | .  | .              | 12                       | 0                     |
| Baja<br>(1)     | 1              | 1      | ,947   | ,051           | 1                        | 18                    |
|                 | 2              | 1      | ,895   | ,070           | 2                        | 17                    |
|                 | 3              | 1      | ,842   | ,084           | 3                        | 16                    |
|                 | 4              | 1      | ,789   | ,094           | 4                        | 15                    |
|                 | 5              | 1      | ,737   | ,101           | 5                        | 14                    |
|                 | 6              | 1      | ,684   | ,107           | 6                        | 13                    |
|                 | 7              | 1      | ,632   | ,111           | 7                        | 12                    |
|                 | 8              | 1      | ,579   | ,113           | 8                        | 11                    |
|                 | 9              | 1      | ,526   | ,115           | 9                        | 10                    |
|                 | 10             | 1      | ,474   | ,115           | 10                       | 9                     |
|                 | 11             | 1      | ,421   | ,113           | 11                       | 8                     |
|                 | 12             | 1      | ,368   | ,111           | 12                       | 7                     |
|                 | 13             | 1      | ,316   | ,107           | 13                       | 6                     |
|                 | 14             | 0      | .  | .              | 13                       | 5                     |
|                 | 15             | 0      | .  | .              | 13                       | 4                     |
|                 | 16             | 0      | .  | .              | 13                       | 3                     |
|                 | 17             | 0      | .  | .              | 13                       | 2                     |
|                 | 18             | 0      | .  | .              | 13                       | 1                     |
|                 | 19             | 0      | .  | .              | 13                       | 0                     |
| Moderada<br>(2) | 1              | 1      | ,909   | ,087           | 1                        | 10                    |
|                 | 2              | 1      | ,818   | ,116           | 2                        | 9                     |
|                 | 3              | 1      | ,727   | ,134           | 3                        | 8                     |
|                 | 4              | 1      | ,636   | ,145           | 4                        | 7                     |
|                 | 5              | 1      | ,545   | ,150           | 5                        | 6                     |
|                 | 6              | 1      | ,455   | ,150           | 6                        | 5                     |
|                 | 7              | 0      | .  | .              | 6                        | 4                     |
|                 | 8              | 0      | .  | .              | 6                        | 3                     |
|                 | 9              | 0      | .  | .              | 6                        | 2                     |
|                 | 10             | 0      | .  | .              | 6                        | 1                     |
|                 | 11             | 0      | .  | .              | 6                        | 0                     |
| Alta (3)        | 1              | 1      | ,833   | ,152           | 1                        | 5                     |
|                 | 2              | 1      | ,667   | ,192           | 2                        | 4                     |
|                 | 3              | 1      | ,500   | ,204           | 3                        | 3                     |
|                 | 4              | 1      | ,333   | ,192           | 4                        | 2                     |
|                 | 5              | 0      | .  | .              | 4                        | 1                     |
|                 | 6              | 0      | .  | .              | 4                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Niveles expresión VEGF-B

| VEGF-B       | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|              |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| Nula (0)     | 1              | 1      | ,969   | ,031           | 1                        | 31                    |
|              | 2              | 1      | ,938   | ,043           | 2                        | 30                    |
|              | 3              | 1      | ,906   | ,052           | 3                        | 29                    |
|              | 4              | 1      | ,875   | ,058           | 4                        | 28                    |
|              | 5              | 1      | ,844   | ,064           | 5                        | 27                    |
|              | 6              | 1      | ,813   | ,069           | 6                        | 26                    |
|              | 7              | 1      | ,781   | ,073           | 7                        | 25                    |
|              | 8              | 1      | ,750   | ,077           | 8                        | 24                    |
|              | 9              | 1      | ,719   | ,079           | 9                        | 23                    |
|              | 10             | 1      | ,688   | ,082           | 10                       | 22                    |
|              | 11             | 1      | ,656   | ,084           | 11                       | 21                    |
|              | 12             | 1      | ,625   | ,086           | 12                       | 20                    |
|              | 13             | 1      | ,594   | ,087           | 13                       | 19                    |
|              | 14             | 1      | ,563   | ,088           | 14                       | 18                    |
|              | 15             | 1      | ,531   | ,088           | 15                       | 17                    |
|              | 16             | 1      | ,500   | ,088           | 16                       | 16                    |
|              | 17             | 1      | ,469   | ,088           | 17                       | 15                    |
|              | 18             | 1      | ,438   | ,088           | 18                       | 14                    |
|              | 19             | 1      | ,406   | ,087           | 19                       | 13                    |
|              | 20             | 1      | ,375   | ,086           | 20                       | 12                    |
|              | 21             | 0      | .  | .              | 20                       | 11                    |
|              | 22             | 0      | .  | .              | 20                       | 10                    |
|              | 23             | 0      | .  | .              | 20                       | 9                     |
|              | 24             | 0      | .  | .              | 20                       | 8                     |
|              | 25             | 0      | .  | .              | 20                       | 7                     |
|              | 26             | 0      | .  | .              | 20                       | 6                     |
|              | 27             | 0      | .  | .              | 20                       | 5                     |
|              | 28             | 0      | .  | .              | 20                       | 4                     |
|              | 29             | 0      | .  | .              | 20                       | 3                     |
|              | 30             | 0      | .  | .              | 20                       | 2                     |
|              | 31             | 0      | .  | .              | 20                       | 1                     |
|              | 32             | 0      | .  | .              | 20                       | 0                     |
| Baja (1)     | 1              | 1      | ,938   | ,061           | 1                        | 15                    |
|              | 2              | 1      | ,875   | ,083           | 2                        | 14                    |
|              | 3              | 1      | ,813   | ,098           | 3                        | 13                    |
|              | 4              | 1      | ,750   | ,108           | 4                        | 12                    |
|              | 5              | 1      | ,688   | ,116           | 5                        | 11                    |
|              | 6              | 1      | ,625   | ,121           | 6                        | 10                    |
|              | 7              | 1      | ,563   | ,124           | 7                        | 9                     |
|              | 8              | 1      | ,500   | ,125           | 8                        | 8                     |
|              | 9              | 1      | ,438   | ,124           | 9                        | 7                     |
|              | 10             | 1      | ,375   | ,121           | 10                       | 6                     |
|              | 11             | 1      | ,313   | ,116           | 11                       | 5                     |
|              | 12             | 1      | ,250   | ,108           | 12                       | 4                     |
|              | 13             | 0      | .  | .              | 12                       | 3                     |
|              | 14             | 0      | .  | .              | 12                       | 2                     |
|              | 15             | 0      | .  | .              | 12                       | 1                     |
|              | 16             | 0      | .  | .              | 12                       | 0                     |
| Moderada (2) | 1              | 1      | ,667   | ,272           | 1                        | 2                     |
|              | 2              | 1      | ,333   | ,272           | 2                        | 1                     |
|              | 3              | 0      | .  | .              | 2                        | 0                     |
| Alta (3)     | 1              | 1      | ,667   | ,272           | 1                        | 2                     |
|              | 2              | 0      | .  | .              | 1                        | 1                     |
|              | 3              | 0      | .  | .              | 1                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Niveles expresión VEGF-C

| VEGF-C          | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|-----------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|                 |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| Nula<br>(0)     | 1              | 1      | ,938   | ,061           | 1                        | 15                    |
|                 | 2              | 1      | ,875   | ,083           | 2                        | 14                    |
|                 | 3              | 1      | ,813   | ,098           | 3                        | 13                    |
|                 | 4              | 1      | ,750   | ,108           | 4                        | 12                    |
|                 | 5              | 1      | ,688   | ,116           | 5                        | 11                    |
|                 | 6              | 1      | ,625   | ,121           | 6                        | 10                    |
|                 | 7              | 1      | ,563   | ,124           | 7                        | 9                     |
|                 | 8              | 1      | ,500   | ,125           | 8                        | 8                     |
|                 | 9              | 0      | .  | .              | 8                        | 7                     |
|                 | 10             | 0      | .  | .              | 8                        | 6                     |
|                 | 11             | 0      | .  | .              | 8                        | 5                     |
|                 | 12             | 0      | .  | .              | 8                        | 4                     |
|                 | 13             | 0      | .  | .              | 8                        | 3                     |
|                 | 14             | 0      | .  | .              | 8                        | 2                     |
|                 | 15             | 0      | .  | .              | 8                        | 1                     |
|                 | 16             | 0      | .  | .              | 8                        | 0                     |
| Baja<br>(1)     | 1              | 1      | ,958   | ,041           | 1                        | 23                    |
|                 | 2              | 1      | ,917   | ,056           | 2                        | 22                    |
|                 | 3              | 1      | ,875   | ,068           | 3                        | 21                    |
|                 | 4              | 1      | ,833   | ,076           | 4                        | 20                    |
|                 | 5              | 1      | ,792   | ,083           | 5                        | 19                    |
|                 | 6              | 1      | ,750   | ,088           | 6                        | 18                    |
|                 | 7              | 1      | ,708   | ,093           | 7                        | 17                    |
|                 | 8              | 1      | ,667   | ,096           | 8                        | 16                    |
|                 | 9              | 1      | ,625   | ,099           | 9                        | 15                    |
|                 | 10             | 1      | ,583   | ,101           | 10                       | 14                    |
|                 | 11             | 1      | ,542   | ,102           | 11                       | 13                    |
|                 | 12             | 1      | ,500   | ,102           | 12                       | 12                    |
|                 | 13             | 1      | ,458   | ,102           | 13                       | 11                    |
|                 | 14             | 1      | ,417   | ,101           | 14                       | 10                    |
|                 | 15             | 1      | ,375   | ,099           | 15                       | 9                     |
|                 | 16             | 1      | ,333   | ,096           | 16                       | 8                     |
|                 | 17             | 0      | .  | .              | 16                       | 7                     |
|                 | 18             | 0      | .  | .              | 16                       | 6                     |
|                 | 19             | 0      | .  | .              | 16                       | 5                     |
|                 | 20             | 0      | .  | .              | 16                       | 4                     |
|                 | 21             | 0      | .  | .              | 16                       | 3                     |
|                 | 22             | 0      | .  | .              | 16                       | 2                     |
|                 | 23             | 0      | .  | .              | 16                       | 1                     |
|                 | 24             | 0      | .  | .              | 16                       | 0                     |
| Moderada<br>(2) | 1              | 1      | ,800   | ,179           | 1                        | 4                     |
|                 | 2              | 1      | ,600   | ,219           | 2                        | 3                     |
|                 | 3              | 1      | ,400   | ,219           | 3                        | 2                     |
|                 | 4              | 1      | ,200   | ,179           | 4                        | 1                     |
|                 | 5              | 0      | .  | .              | 4                        | 0                     |
| Alta (3)        | 1              | 1      | ,889   | ,105           | 1                        | 8                     |
|                 | 2              | 1      | ,778   | ,139           | 2                        | 7                     |
|                 | 3              | 1      | ,667   | ,157           | 3                        | 6                     |
|                 | 4              | 1      | ,556   | ,166           | 4                        | 5                     |
|                 | 5              | 1      | ,444   | ,166           | 5                        | 4                     |
|                 | 6              | 1      | ,333   | ,157           | 6                        | 3                     |
|                 | 7              | 1      | ,222   | ,139           | 7                        | 2                     |
|                 | 8              | 0      | .  | .              | 7                        | 1                     |
|                 | 9              | 0      | .  | .              | 7                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Niveles expresión VEGF-D

| VEGF-D       | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|              |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| Nula (0)     | 1              | 1      | ,958   | ,041           | 1                        | 23                    |
|              | 2              | 1      | ,917   | ,056           | 2                        | 22                    |
|              | 3              | 1      | ,875   | ,068           | 3                        | 21                    |
|              | 4              | 1      | ,833   | ,076           | 4                        | 20                    |
|              | 5              | 1      | ,792   | ,083           | 5                        | 19                    |
|              | 6              | 1      | ,750   | ,088           | 6                        | 18                    |
|              | 7              | 1      | ,708   | ,093           | 7                        | 17                    |
|              | 8              | 1      | ,667   | ,096           | 8                        | 16                    |
|              | 9              | 1      | ,625   | ,099           | 9                        | 15                    |
|              | 10             | 1      | ,583   | ,101           | 10                       | 14                    |
|              | 11             | 1      | ,542   | ,102           | 11                       | 13                    |
|              | 12             | 1      | ,500   | ,102           | 12                       | 12                    |
|              | 13             | 1      | ,458   | ,102           | 13                       | 11                    |
|              | 14             | 1      | ,417   | ,101           | 14                       | 10                    |
|              | 15             | 1      | ,375   | ,099           | 15                       | 9                     |
|              | 16             | 1      | ,333   | ,096           | 16                       | 8                     |
|              | 17             | 0      | .  | .              | 16                       | 7                     |
|              | 18             | 0      | .  | .              | 16                       | 6                     |
|              | 19             | 0      | .  | .              | 16                       | 5                     |
|              | 20             | 0      | .  | .              | 16                       | 4                     |
|              | 21             | 0      | .  | .              | 16                       | 3                     |
|              | 22             | 0      | .  | .              | 16                       | 2                     |
|              | 23             | 0      | .  | .              | 16                       | 1                     |
|              | 24             | 0      | .  | .              | 16                       | 0                     |
| Baja (1)     | 1              | 1      | ,947   | ,051           | 1                        | 18                    |
|              | 2              | 1      | ,895   | ,070           | 2                        | 17                    |
|              | 3              | 1      | ,842   | ,084           | 3                        | 16                    |
|              | 4              | 1      | ,789   | ,094           | 4                        | 15                    |
|              | 5              | 1      | ,737   | ,101           | 5                        | 14                    |
|              | 6              | 1      | ,684   | ,107           | 6                        | 13                    |
|              | 7              | 1      | ,632   | ,111           | 7                        | 12                    |
|              | 8              | 1      | ,579   | ,113           | 8                        | 11                    |
|              | 9              | 1      | ,526   | ,115           | 9                        | 10                    |
|              | 10             | 1      | ,474   | ,115           | 10                       | 9                     |
|              | 11             | 1      | ,421   | ,113           | 11                       | 8                     |
|              | 12             | 1      | ,368   | ,111           | 12                       | 7                     |
|              | 13             | 1      | ,316   | ,107           | 13                       | 6                     |
|              | 14             | 1      | ,263   | ,101           | 14                       | 5                     |
|              | 15             | 1      | ,211   | ,094           | 15                       | 4                     |
|              | 16             | 0      | .  | .              | 15                       | 3                     |
|              | 17             | 0      | .  | .              | 15                       | 2                     |
|              | 18             | 0      | .  | .              | 15                       | 1                     |
|              | 19             | 0      | .  | .              | 15                       | 0                     |
| Moderada (2) | 1              | 1      | ,889   | ,105           | 1                        | 8                     |
|              | 2              | 1      | ,778   | ,139           | 2                        | 7                     |
|              | 3              | 1      | ,667   | ,157           | 3                        | 6                     |
|              | 4              | 0      | .  | .              | 3                        | 5                     |
|              | 5              | 0      | .  | .              | 3                        | 4                     |
|              | 6              | 0      | .  | .              | 3                        | 3                     |
|              | 7              | 0      | .  | .              | 3                        | 2                     |
|              | 8              | 0      | .  | .              | 3                        | 1                     |
|              | 9              | 0      | .  | .              | 3                        | 0                     |
| Alta (3)     | 1              | 1      | ,500   | ,354           | 1                        | 1                     |
|              | 2              | 0      | .  | .              | 1                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Niveles expresión VEGFR1

| VEGFR1       | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|              |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| Nula (0)     | 1              | 1      | ,917   | ,080           | 1                        | 11                    |
|              | 2              | 1      | ,833   | ,108           | 2                        | 10                    |
|              | 3              | 1      | ,750   | ,125           | 3                        | 9                     |
|              | 4              | 1      | ,667   | ,136           | 4                        | 8                     |
|              | 5              | 1      | ,583   | ,142           | 5                        | 7                     |
|              | 6              | 1      | ,500   | ,144           | 6                        | 6                     |
|              | 7              | 1      | ,417   | ,142           | 7                        | 5                     |
|              | 8              | 1      | ,333   | ,136           | 8                        | 4                     |
|              | 9              | 0      | .  | .              | 8                        | 3                     |
|              | 10             | 0      | .  | .              | 8                        | 2                     |
|              | 11             | 0      | .  | .              | 8                        | 1                     |
|              | 12             | 0      | .  | .              | 8                        | 0                     |
| Baja (1)     | 1              | 1      | ,950   | ,049           | 1                        | 19                    |
|              | 2              | 1      | ,900   | ,067           | 2                        | 18                    |
|              | 3              | 1      | ,850   | ,080           | 3                        | 17                    |
|              | 4              | 1      | ,800   | ,089           | 4                        | 16                    |
|              | 5              | 1      | ,750   | ,097           | 5                        | 15                    |
|              | 6              | 1      | ,700   | ,102           | 6                        | 14                    |
|              | 7              | 1      | ,650   | ,107           | 7                        | 13                    |
|              | 8              | 1      | ,600   | ,110           | 8                        | 12                    |
|              | 9              | 1      | ,550   | ,111           | 9                        | 11                    |
|              | 10             | 1      | ,500   | ,112           | 10                       | 10                    |
|              | 11             | 0      | .  | .              | 10                       | 9                     |
|              | 12             | 0      | .  | .              | 10                       | 8                     |
|              | 13             | 0      | .  | .              | 10                       | 7                     |
|              | 14             | 0      | .  | .              | 10                       | 6                     |
|              | 15             | 0      | .  | .              | 10                       | 5                     |
|              | 16             | 0      | .  | .              | 10                       | 4                     |
|              | 17             | 0      | .  | .              | 10                       | 3                     |
|              | 18             | 0      | .  | .              | 10                       | 2                     |
|              | 19             | 0      | .  | .              | 10                       | 1                     |
|              | 20             | 0      | .  | .              | 10                       | 0                     |
| Moderada (2) | 1              | 1      | ,900   | ,095           | 1                        | 9                     |
|              | 2              | 1      | ,800   | ,126           | 2                        | 8                     |
|              | 3              | 1      | ,700   | ,145           | 3                        | 7                     |
|              | 4              | 1      | ,600   | ,155           | 4                        | 6                     |
|              | 5              | 1      | ,500   | ,158           | 5                        | 5                     |
|              | 6              | 1      | ,400   | ,155           | 6                        | 4                     |
|              | 7              | 1      | ,300   | ,145           | 7                        | 3                     |
|              | 8              | 1      | ,200   | ,126           | 8                        | 2                     |
|              | 9              | 0      | .  | .              | 8                        | 1                     |
|              | 10             | 0      | .  | .              | 8                        | 0                     |
| Alta (3)     | 1              | 1      | ,917   | ,080           | 1                        | 11                    |
|              | 2              | 1      | ,833   | ,108           | 2                        | 10                    |
|              | 3              | 1      | ,750   | ,125           | 3                        | 9                     |
|              | 4              | 1      | ,667   | ,136           | 4                        | 8                     |
|              | 5              | 1      | ,583   | ,142           | 5                        | 7                     |
|              | 6              | 1      | ,500   | ,144           | 6                        | 6                     |
|              | 7              | 1      | ,417   | ,142           | 7                        | 5                     |
|              | 8              | 1      | ,333   | ,136           | 8                        | 4                     |
|              | 9              | 1      | ,250   | ,125           | 9                        | 3                     |
|              | 10             | 0      | .  | .              | 9                        | 2                     |
|              | 11             | 0      | .  | .              | 9                        | 1                     |
|              | 12             | 0      | .  | .              | 9                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Niveles expresión VEGFR2

| VEGFR2       | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|              |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| Nula (0)     | 1              | 1      | ,875   | ,117           | 1                        | 7                     |
|              | 2              | 1      | ,750   | ,153           | 2                        | 6                     |
|              | 3              | 1      | ,625   | ,171           | 3                        | 5                     |
|              | 4              | 0      | .  | .              | 3                        | 4                     |
|              | 5              | 0      | .  | .              | 3                        | 3                     |
|              | 6              | 0      | .  | .              | 3                        | 2                     |
|              | 7              | 0      | .  | .              | 3                        | 1                     |
|              | 8              | 0      | .  | .              | 3                        | 0                     |
| Baja (1)     | 1              | 1      | ,944   | ,054           | 1                        | 17                    |
|              | 2              | 1      | ,889   | ,074           | 2                        | 16                    |
|              | 3              | 1      | ,833   | ,088           | 3                        | 15                    |
|              | 4              | 1      | ,778   | ,098           | 4                        | 14                    |
|              | 5              | 1      | ,722   | ,106           | 5                        | 13                    |
|              | 6              | 1      | ,667   | ,111           | 6                        | 12                    |
|              | 7              | 1      | ,611   | ,115           | 7                        | 11                    |
|              | 8              | 1      | ,556   | ,117           | 8                        | 10                    |
|              | 9              | 1      | ,500   | ,118           | 9                        | 9                     |
|              | 10             | 0      | .  | .              | 9                        | 8                     |
|              | 11             | 0      | .  | .              | 9                        | 7                     |
|              | 12             | 0      | .  | .              | 9                        | 6                     |
|              | 13             | 0      | .  | .              | 9                        | 5                     |
|              | 14             | 0      | .  | .              | 9                        | 4                     |
|              | 15             | 0      | .  | .              | 9                        | 3                     |
|              | 16             | 0      | .  | .              | 9                        | 2                     |
|              | 17             | 0      | .  | .              | 9                        | 1                     |
|              | 18             | 0      | .  | .              | 9                        | 0                     |
| Moderada (2) | 1              | 1      | ,933   | ,064           | 1                        | 14                    |
|              | 2              | 1      | ,867   | ,088           | 2                        | 13                    |
|              | 3              | 1      | ,800   | ,103           | 3                        | 12                    |
|              | 4              | 1      | ,733   | ,114           | 4                        | 11                    |
|              | 5              | 1      | ,667   | ,122           | 5                        | 10                    |
|              | 6              | 1      | ,600   | ,126           | 6                        | 9                     |
|              | 7              | 1      | ,533   | ,129           | 7                        | 8                     |
|              | 8              | 1      | ,467   | ,129           | 8                        | 7                     |
|              | 9              | 1      | ,400   | ,126           | 9                        | 6                     |
|              | 10             | 1      | ,333   | ,122           | 10                       | 5                     |
|              | 11             | 1      | ,267   | ,114           | 11                       | 4                     |
|              | 12             | 1      | ,200   | ,103           | 12                       | 3                     |
|              | 13             | 1      | ,133   | ,088           | 13                       | 2                     |
|              | 14             | 0      | .  | .              | 13                       | 1                     |
|              | 15             | 0      | .  | .              | 13                       | 0                     |
| Alta (3)     | 1              | 1      | ,923   | ,074           | 1                        | 12                    |
|              | 2              | 1      | ,846   | ,100           | 2                        | 11                    |
|              | 3              | 1      | ,769   | ,117           | 3                        | 10                    |
|              | 4              | 1      | ,692   | ,128           | 4                        | 9                     |
|              | 5              | 1      | ,615   | ,135           | 5                        | 8                     |
|              | 6              | 1      | ,538   | ,138           | 6                        | 7                     |
|              | 7              | 1      | ,462   | ,138           | 7                        | 6                     |
|              | 8              | 1      | ,385   | ,135           | 8                        | 5                     |
|              | 9              | 1      | ,308   | ,128           | 9                        | 4                     |
|              | 10             | 1      | ,231   | ,117           | 10                       | 3                     |
|              | 11             | 0      | .  | .              | 10                       | 2                     |
|              | 12             | 0      | .  | .              | 10                       | 1                     |
|              | 13             | 0      | .  | .              | 10                       | 0                     |



Tabla supervivencia. Niveles expresión VEGFR3

| VEGFR3       | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|              |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| Nula (0)     | 1              | 1      | ,909   | ,087           | 1                        | 10                    |
|              | 2              | 1      | ,818   | ,116           | 2                        | 9                     |
|              | 3              | 1      | ,727   | ,134           | 3                        | 8                     |
|              | 4              | 1      | ,636   | ,145           | 4                        | 7                     |
|              | 5              | 1      | ,545   | ,150           | 5                        | 6                     |
|              | 6              | 1      | ,455   | ,150           | 6                        | 5                     |
|              | 7              | 1      | ,364   | ,145           | 7                        | 4                     |
|              | 8              | 0      | .  | .              | 7                        | 3                     |
|              | 9              | 0      | .  | .              | 7                        | 2                     |
|              | 10             | 0      | .  | .              | 7                        | 1                     |
|              | 11             | 0      | .  | .              | 7                        | 0                     |
| Baja (1)     | 1              | 1      | ,955   | ,044           | 1                        | 21                    |
|              | 2              | 1      | ,909   | ,061           | 2                        | 20                    |
|              | 3              | 1      | ,864   | ,073           | 3                        | 19                    |
|              | 4              | 1      | ,818   | ,082           | 4                        | 18                    |
|              | 5              | 1      | ,773   | ,089           | 5                        | 17                    |
|              | 6              | 1      | ,727   | ,095           | 6                        | 16                    |
|              | 7              | 1      | ,682   | ,099           | 7                        | 15                    |
|              | 8              | 1      | ,636   | ,103           | 8                        | 14                    |
|              | 9              | 1      | ,591   | ,105           | 9                        | 13                    |
|              | 10             | 1      | ,545   | ,106           | 10                       | 12                    |
|              | 11             | 1      | ,500   | ,107           | 11                       | 11                    |
|              | 12             | 1      | ,455   | ,106           | 12                       | 10                    |
|              | 13             | 1      | ,409   | ,105           | 13                       | 9                     |
|              | 14             | 0      | .  | .              | 13                       | 8                     |
|              | 15             | 0      | .  | .              | 13                       | 7                     |
|              | 16             | 0      | .  | .              | 13                       | 6                     |
|              | 17             | 0      | .  | .              | 13                       | 5                     |
|              | 18             | 0      | .  | .              | 13                       | 4                     |
|              | 19             | 0      | .  | .              | 13                       | 3                     |
|              | 20             | 0      | .  | .              | 13                       | 2                     |
|              | 21             | 0      | .  | .              | 13                       | 1                     |
|              | 22             | 0      | .  | .              | 13                       | 0                     |
| Moderada (2) | 1              | 1      | ,923   | ,074           | 1                        | 12                    |
|              | 2              | 1      | ,846   | ,100           | 2                        | 11                    |
|              | 3              | 1      | ,769   | ,117           | 3                        | 10                    |
|              | 4              | 1      | ,692   | ,128           | 4                        | 9                     |
|              | 5              | 1      | ,615   | ,135           | 5                        | 8                     |
|              | 6              | 1      | ,538   | ,138           | 6                        | 7                     |
|              | 7              | 1      | ,462   | ,138           | 7                        | 6                     |
|              | 8              | 0      | .  | .              | 7                        | 5                     |
|              | 9              | 0      | .  | .              | 7                        | 4                     |
|              | 10             | 0      | .  | .              | 7                        | 3                     |
|              | 11             | 0      | .  | .              | 7                        | 2                     |
|              | 12             | 0      | .  | .              | 7                        | 1                     |
|              | 13             | 0      | .  | .              | 7                        | 0                     |
| Alta (3)     | 1              | 1      | ,875   | ,117           | 1                        | 7                     |
|              | 2              | 1      | ,750   | ,153           | 2                        | 6                     |
|              | 3              | 1      | ,625   | ,171           | 3                        | 5                     |
|              | 4              | 1      | ,500   | ,177           | 4                        | 4                     |
|              | 5              | 1      | ,375   | ,171           | 5                        | 3                     |
|              | 6              | 1      | ,250   | ,153           | 6                        | 2                     |
|              | 7              | 1      | ,125   | ,117           | 7                        | 1                     |
|              | 8              | 1      | ,000   | ,000           | 8                        | 0                     |

**Tablas de supervivencia según la expresión de los factores y receptores de la familia del VEGF en célula endotelial**

**Tabla supervivencia. Expresión VEGF-A**

| VEGF-A | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,950   | ,049           | 1                        | 19                    |
|        | 2              | 1      | ,900   | ,067           | 2                        | 18                    |
|        | 3              | 1      | ,850   | ,080           | 3                        | 17                    |
|        | 4              | 1      | ,800   | ,089           | 4                        | 16                    |
|        | 5              | 1      | ,750   | ,097           | 5                        | 15                    |
|        | 6              | 1      | ,700   | ,102           | 6                        | 14                    |
|        | 7              | 1      | ,650   | ,107           | 7                        | 13                    |
|        | 8              | 1      | ,600   | ,110           | 8                        | 12                    |
|        | 9              | 1      | ,550   | ,111           | 9                        | 11                    |
|        | 10             | 1      | ,500   | ,112           | 10                       | 10                    |
|        | 11             | 1      | ,450   | ,111           | 11                       | 9                     |
|        | 12             | 1      | ,400   | ,110           | 12                       | 8                     |
|        | 13             | 0      | .  | .              | 12                       | 7                     |
|        | 14             | 0      | .  | .              | 12                       | 6                     |
|        | 15             | 0      | .  | .              | 12                       | 5                     |
|        | 16             | 0      | .  | .              | 12                       | 4                     |
|        | 17             | 0      | .  | .              | 12                       | 3                     |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 12                       | 2                     |
|        | 19             | 0      | .  | .              | 12                       | 1                     |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 12                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,963   | ,036           | 1                        | 26                    |
|        | 2              | 1      | ,926   | ,050           | 2                        | 25                    |
|        | 3              | 1      | ,889   | ,060           | 3                        | 24                    |
|        | 4              | 1      | ,852   | ,068           | 4                        | 23                    |
|        | 5              | 1      | ,815   | ,075           | 5                        | 22                    |
|        | 6              | 1      | ,778   | ,080           | 6                        | 21                    |
|        | 7              | 1      | ,741   | ,084           | 7                        | 20                    |
|        | 8              | 1      | ,704   | ,088           | 8                        | 19                    |
|        | 9              | 1      | ,667   | ,091           | 9                        | 18                    |
|        | 10             | 1      | ,630   | ,093           | 10                       | 17                    |
|        | 11             | 1      | ,593   | ,095           | 11                       | 16                    |
|        | 12             | 1      | ,556   | ,096           | 12                       | 15                    |
|        | 13             | 1      | ,519   | ,096           | 13                       | 14                    |
|        | 14             | 1      | ,481   | ,096           | 14                       | 13                    |
|        | 15             | 1      | ,444   | ,096           | 15                       | 12                    |
|        | 16             | 1      | ,407   | ,095           | 16                       | 11                    |
|        | 17             | 0      | .  | .              | 16                       | 10                    |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 16                       | 9                     |
|        | 19             | 0      | .  | .              | 16                       | 8                     |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 16                       | 7                     |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 16                       | 6                     |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 16                       | 5                     |
|        | 23             | 0      | .  | .              | 16                       | 4                     |
|        | 24             | 0      | .  | .              | 16                       | 3                     |
|        | 25             | 0      | .  | .              | 16                       | 2                     |
|        | 26             | 0      | .  | .              | 16                       | 1                     |
|        | 27             | 0      | .  | .              | 16                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGF-B

| VEGF-B | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,980   | ,020           | 1                        | 49                    |
|        | 2              | 1      | ,960   | ,028           | 2                        | 48                    |
|        | 3              | 1      | ,940   | ,034           | 3                        | 47                    |
|        | 4              | 1      | ,920   | ,038           | 4                        | 46                    |
|        | 5              | 1      | ,900   | ,042           | 5                        | 45                    |
|        | 6              | 1      | ,880   | ,046           | 6                        | 44                    |
|        | 7              | 1      | ,860   | ,049           | 7                        | 43                    |
|        | 8              | 1      | ,840   | ,052           | 8                        | 42                    |
|        | 9              | 1      | ,820   | ,054           | 9                        | 41                    |
|        | 10             | 1      | ,800   | ,057           | 10                       | 40                    |
|        | 11             | 1      | ,780   | ,059           | 11                       | 39                    |
|        | 12             | 1      | ,760   | ,060           | 12                       | 38                    |
|        | 13             | 1      | ,740   | ,062           | 13                       | 37                    |
|        | 14             | 1      | ,720   | ,063           | 14                       | 36                    |
|        | 15             | 1      | ,700   | ,065           | 15                       | 35                    |
|        | 16             | 1      | ,680   | ,066           | 16                       | 34                    |
|        | 17             | 1      | ,660   | ,067           | 17                       | 33                    |
|        | 18             | 1      | ,640   | ,068           | 18                       | 32                    |
|        | 19             | 1      | ,620   | ,069           | 19                       | 31                    |
|        | 20             | 1      | ,600   | ,069           | 20                       | 30                    |
|        | 21             | 1      | ,580   | ,070           | 21                       | 29                    |
|        | 22             | 1      | ,560   | ,070           | 22                       | 28                    |
|        | 23             | 1      | ,540   | ,070           | 23                       | 27                    |
|        | 24             | 1      | ,520   | ,071           | 24                       | 26                    |
|        | 25             | 1      | ,500   | ,071           | 25                       | 25                    |
|        | 26             | 1      | ,480   | ,071           | 26                       | 24                    |
|        | 27             | 1      | ,460   | ,070           | 27                       | 23                    |
|        | 28             | 1      | ,440   | ,070           | 28                       | 22                    |
|        | 29             | 1      | ,420   | ,070           | 29                       | 21                    |
|        | 30             | 1      | ,400   | ,069           | 30                       | 20                    |
|        | 31             | 1      | ,380   | ,069           | 31                       | 19                    |
|        | 32             | 1      | ,360   | ,068           | 32                       | 18                    |
|        | 33             | 1      | ,340   | ,067           | 33                       | 17                    |
|        | 34             | 1      | ,320   | ,066           | 34                       | 16                    |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 34                       | 15                    |
|        | 36             | 0      | .  | .              | 34                       | 14                    |
|        | 37             | 0      | .  | .              | 34                       | 13                    |
|        | 38             | 0      | .  | .              | 34                       | 12                    |
|        | 39             | 0      | .  | .              | 34                       | 11                    |
|        | 40             | 0      | .  | .              | 34                       | 10                    |
|        | 41             | 0      | .  | .              | 34                       | 9                     |
|        | 42             | 0      | .  | .              | 34                       | 8                     |
|        | 43             | 0      | .  | .              | 34                       | 7                     |
|        | 44             | 0      | .  | .              | 34                       | 6                     |
|        | 45             | 0      | .  | .              | 34                       | 5                     |
|        | 46             | 0      | .  | .              | 34                       | 4                     |
|        | 47             | 0      | .  | .              | 34                       | 3                     |
|        | 48             | 0      | .  | .              | 34                       | 2                     |
|        | 49             | 0      | .  | .              | 34                       | 1                     |
|        | 50             | 0      | .  | .              | 34                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,750   | ,217           | 1                        | 3                     |
|        | 2              | 0      | .  | .              | 1                        | 2                     |
|        | 3              | 0      | .  | .              | 1                        | 1                     |
|        | 4              | 0      | .  | .              | 1                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGF-C

| VEGF-C | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,981   | ,019           | 1                        | 51                    |
|        | 2              | 1      | ,962   | ,027           | 2                        | 50                    |
|        | 3              | 1      | ,942   | ,032           | 3                        | 49                    |
|        | 4              | 1      | ,923   | ,037           | 4                        | 48                    |
|        | 5              | 1      | ,904   | ,041           | 5                        | 47                    |
|        | 6              | 1      | ,885   | ,044           | 6                        | 46                    |
|        | 7              | 1      | ,865   | ,047           | 7                        | 45                    |
|        | 8              | 1      | ,846   | ,050           | 8                        | 44                    |
|        | 9              | 1      | ,827   | ,052           | 9                        | 43                    |
|        | 10             | 1      | ,808   | ,055           | 10                       | 42                    |
|        | 11             | 1      | ,788   | ,057           | 11                       | 41                    |
|        | 12             | 1      | ,769   | ,058           | 12                       | 40                    |
|        | 13             | 1      | ,750   | ,060           | 13                       | 39                    |
|        | 14             | 1      | ,731   | ,062           | 14                       | 38                    |
|        | 15             | 1      | ,712   | ,063           | 15                       | 37                    |
|        | 16             | 1      | ,692   | ,064           | 16                       | 36                    |
|        | 17             | 1      | ,673   | ,065           | 17                       | 35                    |
|        | 18             | 1      | ,654   | ,066           | 18                       | 34                    |
|        | 19             | 1      | ,635   | ,067           | 19                       | 33                    |
|        | 20             | 1      | ,615   | ,067           | 20                       | 32                    |
|        | 21             | 1      | ,596   | ,068           | 21                       | 31                    |
|        | 22             | 1      | ,577   | ,069           | 22                       | 30                    |
|        | 23             | 1      | ,558   | ,069           | 23                       | 29                    |
|        | 24             | 1      | ,538   | ,069           | 24                       | 28                    |
|        | 25             | 1      | ,519   | ,069           | 25                       | 27                    |
|        | 26             | 1      | ,500   | ,069           | 26                       | 26                    |
|        | 27             | 1      | ,481   | ,069           | 27                       | 25                    |
|        | 28             | 1      | ,462   | ,069           | 28                       | 24                    |
|        | 29             | 1      | ,442   | ,069           | 29                       | 23                    |
|        | 30             | 1      | ,423   | ,069           | 30                       | 22                    |
|        | 31             | 1      | ,404   | ,068           | 31                       | 21                    |
|        | 32             | 1      | ,385   | ,067           | 32                       | 20                    |
|        | 33             | 1      | ,365   | ,067           | 33                       | 19                    |
|        | 34             | 1      | ,346   | ,066           | 34                       | 18                    |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 34                       | 17                    |
|        | 36             | 0      | .  | .              | 34                       | 16                    |
|        | 37             | 0      | .  | .              | 34                       | 15                    |
|        | 38             | 0      | .  | .              | 34                       | 14                    |
|        | 39             | 0      | .  | .              | 34                       | 13                    |
|        | 40             | 0      | .  | .              | 34                       | 12                    |
|        | 41             | 0      | .  | .              | 34                       | 11                    |
|        | 42             | 0      | .  | .              | 34                       | 10                    |
|        | 43             | 0      | .  | .              | 34                       | 9                     |
|        | 44             | 0      | .  | .              | 34                       | 8                     |
|        | 45             | 0      | .  | .              | 34                       | 7                     |
|        | 46             | 0      | .  | .              | 34                       | 6                     |
|        | 47             | 0      | .  | .              | 34                       | 5                     |
|        | 48             | 0      | .  | .              | 34                       | 4                     |
|        | 49             | 0      | .  | .              | 34                       | 3                     |
|        | 50             | 0      | .  | .              | 34                       | 2                     |
|        | 51             | 0      | .  | .              | 34                       | 1                     |
|        | 52             | 0      | .  | .              | 34                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,500   | ,354           | 1                        | 1                     |
|        | 2              | 0      | .  | .              | 1                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGF-D

| VEGF-D | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,971   | ,028           | 1                        | 34                    |
|        | 2              | 1      | ,943   | ,039           | 2                        | 33                    |
|        | 3              | 1      | ,914   | ,047           | 3                        | 32                    |
|        | 4              | 1      | ,886   | ,054           | 4                        | 31                    |
|        | 5              | 1      | ,857   | ,059           | 5                        | 30                    |
|        | 6              | 1      | ,829   | ,064           | 6                        | 29                    |
|        | 7              | 1      | ,800   | ,068           | 7                        | 28                    |
|        | 8              | 1      | ,771   | ,071           | 8                        | 27                    |
|        | 9              | 1      | ,743   | ,074           | 9                        | 26                    |
|        | 10             | 1      | ,714   | ,076           | 10                       | 25                    |
|        | 11             | 1      | ,686   | ,078           | 11                       | 24                    |
|        | 12             | 1      | ,657   | ,080           | 12                       | 23                    |
|        | 13             | 1      | ,629   | ,082           | 13                       | 22                    |
|        | 14             | 1      | ,600   | ,083           | 14                       | 21                    |
|        | 15             | 1      | ,571   | ,084           | 15                       | 20                    |
|        | 16             | 1      | ,543   | ,084           | 16                       | 19                    |
|        | 17             | 1      | ,514   | ,084           | 17                       | 18                    |
|        | 18             | 1      | ,486   | ,084           | 18                       | 17                    |
|        | 19             | 1      | ,457   | ,084           | 19                       | 16                    |
|        | 20             | 1      | ,429   | ,084           | 20                       | 15                    |
|        | 21             | 1      | ,400   | ,083           | 21                       | 14                    |
|        | 22             | 1      | ,371   | ,082           | 22                       | 13                    |
|        | 23             | 1      | ,343   | ,080           | 23                       | 12                    |
|        | 24             | 1      | ,314   | ,078           | 24                       | 11                    |
|        | 25             | 1      | ,286   | ,076           | 25                       | 10                    |
|        | 26             | 1      | ,257   | ,074           | 26                       | 9                     |
|        | 27             | 1      | ,229   | ,071           | 27                       | 8                     |
|        | 28             | 0      | .  | .              | 27                       | 7                     |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 27                       | 6                     |
|        | 30             | 0      | .  | .              | 27                       | 5                     |
|        | 31             | 0      | .  | .              | 27                       | 4                     |
|        | 32             | 0      | .  | .              | 27                       | 3                     |
|        | 33             | 0      | .  | .              | 27                       | 2                     |
|        | 34             | 0      | .  | .              | 27                       | 1                     |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 27                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,947   | ,051           | 1                        | 18                    |
|        | 2              | 1      | ,895   | ,070           | 2                        | 17                    |
|        | 3              | 1      | ,842   | ,084           | 3                        | 16                    |
|        | 4              | 1      | ,789   | ,094           | 4                        | 15                    |
|        | 5              | 1      | ,737   | ,101           | 5                        | 14                    |
|        | 6              | 1      | ,684   | ,107           | 6                        | 13                    |
|        | 7              | 1      | ,632   | ,111           | 7                        | 12                    |
|        | 8              | 1      | ,579   | ,113           | 8                        | 11                    |
|        | 9              | 0      | .  | .              | 8                        | 10                    |
|        | 10             | 0      | .  | .              | 8                        | 9                     |
|        | 11             | 0      | .  | .              | 8                        | 8                     |
|        | 12             | 0      | .  | .              | 8                        | 7                     |
|        | 13             | 0      | .  | .              | 8                        | 6                     |
|        | 14             | 0      | .  | .              | 8                        | 5                     |
|        | 15             | 0      | .  | .              | 8                        | 4                     |
|        | 16             | 0      | .  | .              | 8                        | 3                     |
|        | 17             | 0      | .  | .              | 8                        | 2                     |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 8                        | 1                     |
|        | 19             | 0      | .  | .              | 8                        | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGFR1

| VEGFR1 | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,966   | ,034           | 1                        | 28                    |
|        | 2              | 1      | ,931   | ,047           | 2                        | 27                    |
|        | 3              | 1      | ,897   | ,057           | 3                        | 26                    |
|        | 4              | 1      | ,862   | ,064           | 4                        | 25                    |
|        | 5              | 1      | ,828   | ,070           | 5                        | 24                    |
|        | 6              | 1      | ,793   | ,075           | 6                        | 23                    |
|        | 7              | 1      | ,759   | ,079           | 7                        | 22                    |
|        | 8              | 1      | ,724   | ,083           | 8                        | 21                    |
|        | 9              | 1      | ,690   | ,086           | 9                        | 20                    |
|        | 10             | 1      | ,655   | ,088           | 10                       | 19                    |
|        | 11             | 1      | ,621   | ,090           | 11                       | 18                    |
|        | 12             | 1      | ,586   | ,091           | 12                       | 17                    |
|        | 13             | 1      | ,552   | ,092           | 13                       | 16                    |
|        | 14             | 1      | ,517   | ,093           | 14                       | 15                    |
|        | 15             | 1      | ,483   | ,093           | 15                       | 14                    |
|        | 16             | 1      | ,448   | ,092           | 16                       | 13                    |
|        | 17             | 1      | ,414   | ,091           | 17                       | 12                    |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 17                       | 11                    |
|        | 19             | 0      | .  | .              | 17                       | 10                    |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 17                       | 9                     |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 17                       | 8                     |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 17                       | 7                     |
|        | 23             | 0      | .  | .              | 17                       | 6                     |
|        | 24             | 0      | .  | .              | 17                       | 5                     |
|        | 25             | 0      | .  | .              | 17                       | 4                     |
|        | 26             | 0      | .  | .              | 17                       | 3                     |
|        | 27             | 0      | .  | .              | 17                       | 2                     |
|        | 28             | 0      | .  | .              | 17                       | 1                     |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 17                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,957   | ,043           | 1                        | 22                    |
|        | 2              | 1      | ,913   | ,059           | 2                        | 21                    |
|        | 3              | 1      | ,870   | ,070           | 3                        | 20                    |
|        | 4              | 1      | ,826   | ,079           | 4                        | 19                    |
|        | 5              | 1      | ,783   | ,086           | 5                        | 18                    |
|        | 6              | 1      | ,739   | ,092           | 6                        | 17                    |
|        | 7              | 1      | ,696   | ,096           | 7                        | 16                    |
|        | 8              | 1      | ,652   | ,099           | 8                        | 15                    |
|        | 9              | 1      | ,609   | ,102           | 9                        | 14                    |
|        | 10             | 1      | ,565   | ,103           | 10                       | 13                    |
|        | 11             | 1      | ,522   | ,104           | 11                       | 12                    |
|        | 12             | 1      | ,478   | ,104           | 12                       | 11                    |
|        | 13             | 1      | ,435   | ,103           | 13                       | 10                    |
|        | 14             | 1      | ,391   | ,102           | 14                       | 9                     |
|        | 15             | 1      | ,348   | ,099           | 15                       | 8                     |
|        | 16             | 1      | ,304   | ,096           | 16                       | 7                     |
|        | 17             | 0      | .  | .              | 16                       | 6                     |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 16                       | 5                     |
|        | 19             | 0      | .  | .              | 16                       | 4                     |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 16                       | 3                     |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 16                       | 2                     |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 16                       | 1                     |
|        | 23             | 0      | .  | .              | 16                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGFR2

| VEGFR2 | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,960   | ,039           | 1                        | 24                    |
|        | 2              | 1      | ,920   | ,054           | 2                        | 23                    |
|        | 3              | 1      | ,880   | ,065           | 3                        | 22                    |
|        | 4              | 1      | ,840   | ,073           | 4                        | 21                    |
|        | 5              | 1      | ,800   | ,080           | 5                        | 20                    |
|        | 6              | 1      | ,760   | ,085           | 6                        | 19                    |
|        | 7              | 1      | ,720   | ,090           | 7                        | 18                    |
|        | 8              | 1      | ,680   | ,093           | 8                        | 17                    |
|        | 9              | 1      | ,640   | ,096           | 9                        | 16                    |
|        | 10             | 1      | ,600   | ,098           | 10                       | 15                    |
|        | 11             | 1      | ,560   | ,099           | 11                       | 14                    |
|        | 12             | 1      | ,520   | ,100           | 12                       | 13                    |
|        | 13             | 1      | ,480   | ,100           | 13                       | 12                    |
|        | 14             | 1      | ,440   | ,099           | 14                       | 11                    |
|        | 15             | 0      | .  | .              | 14                       | 10                    |
|        | 16             | 0      | .  | .              | 14                       | 9                     |
|        | 17             | 0      | .  | .              | 14                       | 8                     |
|        | 18             | 0      | .  | .              | 14                       | 7                     |
|        | 19             | 0      | .  | .              | 14                       | 6                     |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 14                       | 5                     |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 14                       | 4                     |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 14                       | 3                     |
|        | 23             | 0      | .  | .              | 14                       | 2                     |
|        | 24             | 0      | .  | .              | 14                       | 1                     |
|        | 25             | 0      | .  | .              | 14                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,963   | ,036           | 1                        | 26                    |
|        | 2              | 1      | ,926   | ,050           | 2                        | 25                    |
|        | 3              | 1      | ,889   | ,060           | 3                        | 24                    |
|        | 4              | 1      | ,852   | ,068           | 4                        | 23                    |
|        | 5              | 1      | ,815   | ,075           | 5                        | 22                    |
|        | 6              | 1      | ,778   | ,080           | 6                        | 21                    |
|        | 7              | 1      | ,741   | ,084           | 7                        | 20                    |
|        | 8              | 1      | ,704   | ,088           | 8                        | 19                    |
|        | 9              | 1      | ,667   | ,091           | 9                        | 18                    |
|        | 10             | 1      | ,630   | ,093           | 10                       | 17                    |
|        | 11             | 1      | ,593   | ,095           | 11                       | 16                    |
|        | 12             | 1      | ,556   | ,096           | 12                       | 15                    |
|        | 13             | 1      | ,519   | ,096           | 13                       | 14                    |
|        | 14             | 1      | ,481   | ,096           | 14                       | 13                    |
|        | 15             | 1      | ,444   | ,096           | 15                       | 12                    |
|        | 16             | 1      | ,407   | ,095           | 16                       | 11                    |
|        | 17             | 1      | ,370   | ,093           | 17                       | 10                    |
|        | 18             | 1      | ,333   | ,091           | 18                       | 9                     |
|        | 19             | 1      | ,296   | ,088           | 19                       | 8                     |
|        | 20             | 0      | .  | .              | 19                       | 7                     |
|        | 21             | 0      | .  | .              | 19                       | 6                     |
|        | 22             | 0      | .  | .              | 19                       | 5                     |
|        | 23             | 0      | .  | .              | 19                       | 4                     |
|        | 24             | 0      | .  | .              | 19                       | 3                     |
|        | 25             | 0      | .  | .              | 19                       | 2                     |
|        | 26             | 0      | .  | .              | 19                       | 1                     |
|        | 27             | 0      | .  | .              | 19                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Expresión VEGFR3

| VEGFR3 | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|--------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|        |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| No     | 1              | 1      | ,976   | ,024           | 1                        | 40                    |
|        | 2              | 1      | ,951   | ,034           | 2                        | 39                    |
|        | 3              | 1      | ,927   | ,041           | 3                        | 38                    |
|        | 4              | 1      | ,902   | ,046           | 4                        | 37                    |
|        | 5              | 1      | ,878   | ,051           | 5                        | 36                    |
|        | 6              | 1      | ,854   | ,055           | 6                        | 35                    |
|        | 7              | 1      | ,829   | ,059           | 7                        | 34                    |
|        | 8              | 1      | ,805   | ,062           | 8                        | 33                    |
|        | 9              | 1      | ,780   | ,065           | 9                        | 32                    |
|        | 10             | 1      | ,756   | ,067           | 10                       | 31                    |
|        | 11             | 1      | ,732   | ,069           | 11                       | 30                    |
|        | 12             | 1      | ,707   | ,071           | 12                       | 29                    |
|        | 13             | 1      | ,683   | ,073           | 13                       | 28                    |
|        | 14             | 1      | ,659   | ,074           | 14                       | 27                    |
|        | 15             | 1      | ,634   | ,075           | 15                       | 26                    |
|        | 16             | 1      | ,610   | ,076           | 16                       | 25                    |
|        | 17             | 1      | ,585   | ,077           | 17                       | 24                    |
|        | 18             | 1      | ,561   | ,078           | 18                       | 23                    |
|        | 19             | 1      | ,537   | ,078           | 19                       | 22                    |
|        | 20             | 1      | ,512   | ,078           | 20                       | 21                    |
|        | 21             | 1      | ,488   | ,078           | 21                       | 20                    |
|        | 22             | 1      | ,463   | ,078           | 22                       | 19                    |
|        | 23             | 1      | ,439   | ,078           | 23                       | 18                    |
|        | 24             | 1      | ,415   | ,077           | 24                       | 17                    |
|        | 25             | 1      | ,390   | ,076           | 25                       | 16                    |
|        | 26             | 1      | ,366   | ,075           | 26                       | 15                    |
|        | 27             | 1      | ,341   | ,074           | 27                       | 14                    |
|        | 28             | 1      | ,317   | ,073           | 28                       | 13                    |
|        | 29             | 0      | .  | .              | 28                       | 12                    |
|        | 30             | 0      | .  | .              | 28                       | 11                    |
|        | 31             | 0      | .  | .              | 28                       | 10                    |
|        | 32             | 0      | .  | .              | 28                       | 9                     |
|        | 33             | 0      | .  | .              | 28                       | 8                     |
|        | 34             | 0      | .  | .              | 28                       | 7                     |
|        | 35             | 0      | .  | .              | 28                       | 6                     |
|        | 36             | 0      | .  | .              | 28                       | 5                     |
|        | 37             | 0      | .  | .              | 28                       | 4                     |
|        | 38             | 0      | .  | .              | 28                       | 3                     |
|        | 39             | 0      | .  | .              | 28                       | 2                     |
|        | 40             | 0      | .  | .              | 28                       | 1                     |
|        | 41             | 0      | .  | .              | 28                       | 0                     |
| Si     | 1              | 1      | ,917   | ,080           | 1                        | 11                    |
|        | 2              | 1      | ,833   | ,108           | 2                        | 10                    |
|        | 3              | 1      | ,750   | ,125           | 3                        | 9                     |
|        | 4              | 1      | ,667   | ,136           | 4                        | 8                     |
|        | 5              | 1      | ,583   | ,142           | 5                        | 7                     |
|        | 6              | 1      | ,500   | ,144           | 6                        | 6                     |
|        | 7              | 0      | .  | .              | 6                        | 5                     |
|        | 8              | 0      | .  | .              | 6                        | 4                     |
|        | 9              | 0      | .  | .              | 6                        | 3                     |
|        | 10             | 0      | .  | .              | 6                        | 2                     |
|        | 11             | 0      | .  | .              | 6                        | 1                     |
|        | 12             | 0      | .  | .              | 6                        | 0                     |



**ANEXO III****Tablas de supervivencia estudio inmunoenzimático**

Tabla de supervivencia global

|    | Tiempo<br>(meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|----|-------------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|    |                   |        | Estimado   | Error Standard |                          |                       |
| 1  | 1,100             | 1      | ,964   | ,035           | 1                        | 27                    |
| 2  | 1,567             | 1      | ,929   | ,049           | 2                        | 26                    |
| 3  | 2,533             | 1      | ,893   | ,058           | 3                        | 25                    |
| 4  | 2,733             | 1      | ,857   | ,066           | 4                        | 24                    |
| 5  | 2,800             | 1      | ,821   | ,072           | 5                        | 23                    |
| 6  | 4,267             | 1      | ,786   | ,078           | 6                        | 22                    |
| 7  | 4,600             | 1      | ,750   | ,082           | 7                        | 21                    |
| 8  | 5,067             | 1      | ,714   | ,085           | 8                        | 20                    |
| 9  | 6,533             | 1      | ,679   | ,088           | 9                        | 19                    |
| 10 | 6,633             | 1      | ,643   | ,091           | 10                       | 18                    |
| 11 | 6,767             | 1      | ,607   | ,092           | 11                       | 17                    |
| 12 | 7,300             | 1      | ,571   | ,094           | 12                       | 16                    |
| 13 | 8,567             | 1      | ,536   | ,094           | 13                       | 15                    |
| 14 | 9,100             | 1      | ,500   | ,094           | 14                       | 14                    |
| 15 | 9,200             | 1      | ,464   | ,094           | 15                       | 13                    |
| 16 | 9,233             | 1      | ,429   | ,094           | 16                       | 12                    |
| 17 | 9,633             | 1      | ,393   | ,092           | 17                       | 11                    |
| 18 | 12,167            | 1      | ,357   | ,091           | 18                       | 10                    |
| 19 | 12,300            | 1      | ,321   | ,088           | 19                       | 9                     |
| 20 | 13,400            | 1      | ,286   | ,085           | 20                       | 8                     |
| 21 | 13,433            | 1      | ,250   | ,082           | 21                       | 7                     |
| 22 | 16,833            | 1      | ,214   | ,078           | 22                       | 6                     |
| 23 | 17,567            | 1      | ,179   | ,072           | 23                       | 5                     |
| 24 | 18,600            | 1      | ,143   | ,066           | 24                       | 4                     |
| 25 | 19,467            | 1      | ,107   | ,058           | 25                       | 3                     |
| 26 | 20,067            | 1      | ,071   | ,049           | 26                       | 2                     |
| 27 | 23,167            | 1      | ,036   | ,035           | 27                       | 1                     |
| 28 | 24,267            | 1      | ,000   | ,000           | 28                       | 0                     |

Tabla de supervivencia. Edad

| Edad      | Tiempo (meses) | Estado | Proporción acumulada de supervivencia |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|-----------|----------------|--------|---------------------------------------|----------------|--------------------------|-----------------------|
|           |                |        | Estimado                              | Error Standard |                          |                       |
| <67 años  | 1              | 1      | ,952                                  | ,046           | 1                        | 20                    |
|           | 2              | 1      | ,905                                  | ,064           | 2                        | 19                    |
|           | 3              | 1      | ,857                                  | ,076           | 3                        | 18                    |
|           | 4              | 1      | ,810                                  | ,086           | 4                        | 17                    |
|           | 5              | 1      | ,762                                  | ,093           | 5                        | 16                    |
|           | 6              | 1      | ,714                                  | ,099           | 6                        | 15                    |
|           | 7              | 1      | ,667                                  | ,103           | 7                        | 14                    |
|           | 8              | 1      | ,619                                  | ,106           | 8                        | 13                    |
|           | 9              | 1      | ,571                                  | ,108           | 9                        | 12                    |
|           | 10             | 1      | ,524                                  | ,109           | 10                       | 11                    |
|           | 11             | 1      | ,476                                  | ,109           | 11                       | 10                    |
|           | 12             | 1      | ,429                                  | ,108           | 12                       | 9                     |
|           | 13             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 8                     |
|           | 14             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 7                     |
|           | 15             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 6                     |
|           | 16             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 5                     |
|           | 17             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 4                     |
|           | 18             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 3                     |
|           | 19             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 2                     |
|           | 20             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 1                     |
|           | 21             | 0      | .                                     | .              | 12                       | 0                     |
| > 67 años | 1              | 1      | ,958                                  | ,041           | 1                        | 23                    |
|           | 2              | 1      | ,917                                  | ,056           | 2                        | 22                    |
|           | 3              | 1      | ,875                                  | ,068           | 3                        | 21                    |
|           | 4              | 1      | ,833                                  | ,076           | 4                        | 20                    |
|           | 5              | 1      | ,792                                  | ,083           | 5                        | 19                    |
|           | 6              | 1      | ,750                                  | ,088           | 6                        | 18                    |
|           | 7              | 1      | ,708                                  | ,093           | 7                        | 17                    |
|           | 8              | 1      | ,667                                  | ,096           | 8                        | 16                    |
|           | 9              | 1      | ,625                                  | ,099           | 9                        | 15                    |
|           | 10             | 1      | ,583                                  | ,101           | 10                       | 14                    |
|           | 11             | 1      | ,542                                  | ,102           | 11                       | 13                    |
|           | 12             | 1      | ,500                                  | ,102           | 12                       | 12                    |
|           | 13             | 1      | ,458                                  | ,102           | 13                       | 11                    |
|           | 14             | 1      | ,417                                  | ,101           | 14                       | 10                    |
|           | 15             | 1      | ,375                                  | ,099           | 15                       | 9                     |
|           | 16             | 1      | ,333                                  | ,096           | 16                       | 8                     |
|           | 17             | 0      | .                                     | .              | 16                       | 7                     |
|           | 18             | 0      | .                                     | .              | 16                       | 6                     |
|           | 19             | 0      | .                                     | .              | 16                       | 5                     |
|           | 20             | 0      | .                                     | .              | 16                       | 4                     |
|           | 21             | 0      | .                                     | .              | 16                       | 3                     |
|           | 22             | 0      | .                                     | .              | 16                       | 2                     |
|           | 23             | 0      | .                                     | .              | 16                       | 1                     |
|           | 24             | 0      | .                                     | .              | 16                       | 0                     |

Tabla supervivencia. Tamaño

| Tamaño  |    | Tiempo<br>(meses) | Estado | Proporción acumulada<br>de supervivencia |                   | Nº de eventos<br>acumulados | Nº de Casos<br>restantes |
|---------|----|-------------------|--------|--|-------------------|-----------------------------|--------------------------|
|         |    |                   |        | Estimada                                 | Error<br>Standard |                             |                          |
| <5,41cm | 1  | 2,533             | 1      | ,958                                     | ,041              | 1                           | 23                       |
|         | 2  | 4,600             | 1      | ,917                                     | ,056              | 2                           | 22                       |
|         | 3  | 5,067             | 1      | ,875                                     | ,068              | 3                           | 21                       |
|         | 4  | 12,167            | 1      | ,833                                     | ,076              | 4                           | 20                       |
|         | 5  | 12,300            | 1      | ,792                                     | ,083              | 5                           | 19                       |
|         | 6  | 16,833            | 1      | ,750                                     | ,088              | 6                           | 18                       |
|         | 7  | 19,467            | 1      | ,708                                     | ,093              | 7                           | 17                       |
|         | 8  | 20,067            | 1      | ,667                                     | ,096              | 8                           | 16                       |
|         | 9  | 23,167            | 1      | ,625                                     | ,099              | 9                           | 15                       |
|         | 10 | 24,267            | 1      | ,583                                     | ,101              | 10                          | 14                       |
|         | 11 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 13                       |
|         | 12 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 12                       |
|         | 13 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 11                       |
|         | 14 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 10                       |
|         | 15 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 9                        |
|         | 16 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 8                        |
|         | 17 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 7                        |
|         | 18 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 6                        |
|         | 19 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 5                        |
|         | 20 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 4                        |
|         | 21 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 3                        |
|         | 22 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 2                        |
|         | 23 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 1                        |
|         | 24 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 10                          | 0                        |
| >5,41cm | 1  | 1,100             | 1      | ,933                                     | ,064              | 1                           | 14                       |
|         | 2  | 1,567             | 1      | ,867                                     | ,088              | 2                           | 13                       |
|         | 3  | 2,733             | 1      | ,800                                     | ,103              | 3                           | 12                       |
|         | 4  | 2,800             | 1      | ,733                                     | ,114              | 4                           | 11                       |
|         | 5  | 4,267             | 1      | ,667                                     | ,122              | 5                           | 10                       |
|         | 6  | 6,533             | 1      | ,600                                     | ,126              | 6                           | 9                        |
|         | 7  | 6,767             | 1      | ,533                                     | ,129              | 7                           | 8                        |
|         | 8  | 8,567             | 1      | ,467                                     | ,129              | 8                           | 7                        |
|         | 9  | 9,100             | 1      | ,400                                     | ,126              | 9                           | 6                        |
|         | 10 | 9,233             | 1      | ,333                                     | ,122              | 10                          | 5                        |
|         | 11 | 9,633             | 1      | ,267                                     | ,114              | 11                          | 4                        |
|         | 12 | 13,400            | 1      | ,200                                     | ,103              | 12                          | 3                        |
|         | 13 | 13,433            | 1      | ,133                                     | ,088              | 13                          | 2                        |
|         | 14 | 18,600            | 1      | ,067                                     | ,064              | 14                          | 1                        |
|         | 15 | 24,367            | 0      | .  | .                 | 14                          | 0                        |

Tabla supervivencia. Estirpe histológica

| Histología     | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |    |
|----------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|----|
|                |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |    |
| Adenocarcinoma | 1              | 6,767  | 1  | ,875           | ,117                     | 1                     | 7  |
|                | 2              | 7,300  | 1  | ,750           | ,153                     | 2                     | 6  |
|                | 3              | 12,167 | 1  | ,625           | ,171                     | 3                     | 5  |
|                | 4              | 16,833 | 1  | ,500           | ,177                     | 4                     | 4  |
|                | 5              | 24,267 | 1  | ,375           | ,171                     | 5                     | 3  |
|                | 6              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 5                     | 2  |
|                | 7              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 5                     | 1  |
|                | 8              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 5                     | 0  |
| Epidermoide    | 1              | 1,100  | 1  | ,952           | ,046                     | 1                     | 20 |
|                | 2              | 1,567  | 1  | ,905           | ,064                     | 2                     | 19 |
|                | 3              | 2,533  | 1  | ,857           | ,076                     | 3                     | 18 |
|                | 4              | 2,800  | 1  | ,810           | ,086                     | 4                     | 17 |
|                | 5              | 4,267  | 1  | ,762           | ,093                     | 5                     | 16 |
|                | 6              | 8,567  | 1  | ,714           | ,099                     | 6                     | 15 |
|                | 7              | 9,100  | 1  | ,667           | ,103                     | 7                     | 14 |
|                | 8              | 9,200  | 1  | ,619           | ,106                     | 8                     | 13 |
|                | 9              | 9,233  | 1  | ,571           | ,108                     | 9                     | 12 |
|                | 10             | 9,633  | 1  | ,524           | ,109                     | 10                    | 11 |
|                | 11             | 12,300 | 1  | ,476           | ,109                     | 11                    | 10 |
|                | 12             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 9  |
|                | 13             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 8  |
|                | 14             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 7  |
|                | 15             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 6  |
|                | 16             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 5  |
|                | 17             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 4  |
|                | 18             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 3  |
|                | 19             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 2  |
|                | 20             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 1  |
|                | 21             | 24,367 | 0  | .              | .                        | 11                    | 0  |
| C. Grandes     | 1              | 4,600  | 1  | ,857           | ,132                     | 1                     | 6  |
|                | 2              | 6,533  | 1  | ,714           | ,171                     | 2                     | 5  |
|                | 3              | 13,400 | 1  | ,571           | ,187                     | 3                     | 4  |
|                | 4              | 19,467 | 1  | ,429           | ,187                     | 4                     | 3  |
|                | 5              | 20,067 | 1  | ,286           | ,171                     | 5                     | 2  |
|                | 6              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 5                     | 1  |
|                | 7              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 5                     | 0  |
| C. Pequeñas    | 1              | 2,733  | 1  | ,889           | ,105                     | 1                     | 8  |
|                | 2              | 5,067  | 1  | ,778           | ,139                     | 2                     | 7  |
|                | 3              | 6,633  | 1  | ,667           | ,157                     | 3                     | 6  |
|                | 4              | 13,433 | 1  | ,556           | ,166                     | 4                     | 5  |
|                | 5              | 17,567 | 1  | ,444           | ,166                     | 5                     | 4  |
|                | 6              | 18,600 | 1  | ,333           | ,157                     | 6                     | 3  |
|                | 7              | 23,167 | 1  | ,222           | ,139                     | 7                     | 2  |
|                | 8              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 7                     | 1  |
|                | 9              | 24,367 | 0  | .              | .                        | 7                     | 0  |

Tabla supervivencia. Estadio

| Estadio | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº de Casos restantes |
|---------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|-----------------------|
|         |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                       |
| I-II    | 1              | 1      | ,933   | ,064           | 1                        | 14                    |
|         | 2              | 1      | ,867   | ,088           | 2                        | 13                    |
|         | 3              | 1      | ,800   | ,103           | 3                        | 12                    |
|         | 4              | 0      | .  | .              | 3                        | 11                    |
|         | 5              | 0      | .  | .              | 3                        | 10                    |
|         | 6              | 0      | .  | .              | 3                        | 9                     |
|         | 7              | 0      | .  | .              | 3                        | 8                     |
|         | 8              | 0      | .  | .              | 3                        | 7                     |
|         | 9              | 0      | .  | .              | 3                        | 6                     |
|         | 10             | 0      | .  | .              | 3                        | 5                     |
|         | 11             | 0      | .  | .              | 3                        | 4                     |
|         | 12             | 0      | .  | .              | 3                        | 3                     |
|         | 13             | 0      | .  | .              | 3                        | 2                     |
|         | 14             | 0      | .  | .              | 3                        | 1                     |
|         | 15             | 0      | .  | .              | 3                        | 0                     |
| III-IV  | 1              | 1      | ,967   | ,033           | 1                        | 29                    |
|         | 2              | 1      | ,933   | ,046           | 2                        | 28                    |
|         | 3              | 1      | ,900   | ,055           | 3                        | 27                    |
|         | 4              | 1      | ,867   | ,062           | 4                        | 26                    |
|         | 5              | 1      | ,833   | ,068           | 5                        | 25                    |
|         | 6              | 1      | ,800   | ,073           | 6                        | 24                    |
|         | 7              | 1      | ,767   | ,077           | 7                        | 23                    |
|         | 8              | 1      | ,733   | ,081           | 8                        | 22                    |
|         | 9              | 1      | ,700   | ,084           | 9                        | 21                    |
|         | 10             | 1      | ,667   | ,086           | 10                       | 20                    |
|         | 11             | 1      | ,633   | ,088           | 11                       | 19                    |
|         | 12             | 1      | ,600   | ,089           | 12                       | 18                    |
|         | 13             | 1      | ,567   | ,090           | 13                       | 17                    |
|         | 14             | 1      | ,533   | ,091           | 14                       | 16                    |
|         | 15             | 1      | ,500   | ,091           | 15                       | 15                    |
|         | 16             | 1      | ,467   | ,091           | 16                       | 14                    |
|         | 17             | 1      | ,433   | ,090           | 17                       | 13                    |
|         | 18             | 1      | ,400   | ,089           | 18                       | 12                    |
|         | 19             | 1      | ,367   | ,088           | 19                       | 11                    |
|         | 20             | 1      | ,333   | ,086           | 20                       | 10                    |
|         | 21             | 1      | ,300   | ,084           | 21                       | 9                     |
|         | 22             | 1      | ,267   | ,081           | 22                       | 8                     |
|         | 23             | 1      | ,233   | ,077           | 23                       | 7                     |
|         | 24             | 1      | ,200   | ,073           | 24                       | 6                     |
|         | 25             | 1      | ,167   | ,068           | 25                       | 5                     |
|         | 26             | 0      | .  | .              | 25                       | 4                     |
|         | 27             | 0      | .  | .              | 25                       | 3                     |
|         | 28             | 0      | .  | .              | 25                       | 2                     |
|         | 29             | 0      | .  | .              | 25                       | 1                     |
|         | 30             | 0      | .  | .              | 25                       | 0                     |

Tabla supervivencia. VEGF-A en suero

| VEGF-A<br>(suero)  | Tiempo<br>(meses) | Estado | Proporción de supervivencia<br>acumulada en el tiempo |                   | Nº de eventos<br>acumulados | Nº Casos<br>restantes |
|--------------------|-------------------|--------|---|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
|                    |                   |        | Estimada  | Error<br>Standard |                             |                       |
| <434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,964  | ,035              | 1                           | 27                    |
|                    | 2                 | 1      | ,929  | ,049              | 2                           | 26                    |
|                    | 3                 | 1      | ,893  | ,058              | 3                           | 25                    |
|                    | 4                 | 1      | ,857  | ,066              | 4                           | 24                    |
|                    | 5                 | 1      | ,821  | ,072              | 5                           | 23                    |
|                    | 6                 | 1      | ,786  | ,078              | 6                           | 22                    |
|                    | 7                 | 1      | ,750  | ,082              | 7                           | 21                    |
|                    | 8                 | 1      | ,714  | ,085              | 8                           | 20                    |
|                    | 9                 | 1      | ,679  | ,088              | 9                           | 19                    |
|                    | 10                | 1      | ,643  | ,091              | 10                          | 18                    |
|                    | 11                | 1      | ,607  | ,092              | 11                          | 17                    |
|                    | 12                | 1      | ,571  | ,094              | 12                          | 16                    |
|                    | 13                | 1      | ,536  | ,094              | 13                          | 15                    |
|                    | 14                | 1      | ,500  | ,094              | 14                          | 14                    |
|                    | 15                | 0      | .   | .                 | 14                          | 13                    |
|                    | 16                | 0      | .   | .                 | 14                          | 12                    |
|                    | 17                | 0      | .   | .                 | 14                          | 11                    |
|                    | 18                | 0      | .   | .                 | 14                          | 10                    |
|                    | 19                | 0      | .   | .                 | 14                          | 9                     |
|                    | 20                | 0      | .   | .                 | 14                          | 8                     |
|                    | 21                | 0      | .   | .                 | 14                          | 7                     |
|                    | 22                | 0      | .   | .                 | 14                          | 6                     |
|                    | 23                | 0      | .   | .                 | 14                          | 5                     |
|                    | 24                | 0      | .   | .                 | 14                          | 4                     |
|                    | 25                | 0      | .   | .                 | 14                          | 3                     |
|                    | 26                | 0      | .   | .                 | 14                          | 2                     |
|                    | 27                | 0      | .   | .                 | 14                          | 1                     |
|                    | 28                | 0      | .   | .                 | 14                          | 0                     |
| >434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,938  | ,061              | 1                           | 15                    |
|                    | 2                 | 1      | ,875  | ,083              | 2                           | 14                    |
|                    | 3                 | 1      | ,813  | ,098              | 3                           | 13                    |
|                    | 4                 | 1      | ,750  | ,108              | 4                           | 12                    |
|                    | 5                 | 1      | ,688  | ,116              | 5                           | 11                    |
|                    | 6                 | 1      | ,625  | ,121              | 6                           | 10                    |
|                    | 7                 | 1      | ,563  | ,124              | 7                           | 9                     |
|                    | 8                 | 1      | ,500  | ,125              | 8                           | 8                     |
|                    | 9                 | 1      | ,438  | ,124              | 9                           | 7                     |
|                    | 10                | 1      | ,375  | ,121              | 10                          | 6                     |
|                    | 11                | 1      | ,313  | ,116              | 11                          | 5                     |
|                    | 12                | 1      | ,250  | ,108              | 12                          | 4                     |
|                    | 13                | 1      | ,188  | ,098              | 13                          | 3                     |
|                    | 14                | 1      | ,125  | ,083              | 14                          | 2                     |
|                    | 15                | 0      | .   | .                 | 14                          | 1                     |
|                    | 16                | 0      | .   | .                 | 14                          | 0                     |

**Tablas de supervivencia según la edad y la concentración de  
VEGF-A en suero**

Tabla supervivencia. Edad &lt;67 años

| VEGF-A<br>(suero)  | Tiempo<br>(meses) | Estado | Proporción de supervivencia<br>acumulada en el tiempo |                   | Nº de eventos<br>acumulados | Nº de Casos<br>restantes |
|--------------------|-------------------|--------|---|-------------------|-----------------------------|--------------------------|
|                    |                   |        | Estimada  | Error<br>Standard |                             |                          |
| <434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,929  | ,069              | 1                           | 13                       |
|                    | 2                 | 1      | ,857  | ,094              | 2                           | 12                       |
|                    | 3                 | 1      | ,786  | ,110              | 3                           | 11                       |
|                    | 4                 | 1      | ,714  | ,121              | 4                           | 10                       |
|                    | 5                 | 1      | ,643  | ,128              | 5                           | 9                        |
|                    | 6                 | 1      | ,571  | ,132              | 6                           | 8                        |
|                    | 7                 | 1      | ,500  | ,134              | 7                           | 7                        |
|                    | 8                 | 0      | .   | .                 | 7                           | 6                        |
|                    | 9                 | 0      | .   | .                 | 7                           | 5                        |
|                    | 10                | 0      | .   | .                 | 7                           | 4                        |
|                    | 11                | 0      | .   | .                 | 7                           | 3                        |
|                    | 12                | 0      | .   | .                 | 7                           | 2                        |
|                    | 13                | 0      | .   | .                 | 7                           | 1                        |
|                    | 14                | 0      | .   | .                 | 7                           | 0                        |
| >434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,857  | ,132              | 1                           | 6                        |
|                    | 2                 | 1      | ,714  | ,171              | 2                           | 5                        |
|                    | 3                 | 1      | ,571  | ,187              | 3                           | 4                        |
|                    | 4                 | 1      | ,429  | ,187              | 4                           | 3                        |
|                    | 5                 | 1      | ,286  | ,171              | 5                           | 2                        |
|                    | 6                 | 0      | .   | .                 | 5                           | 1                        |
|                    | 7                 | 0      | .   | .                 | 5                           | 0                        |

Tabla supervivencia. Edad &gt;67 años

| VEGF-A<br>(suero)  | Tiempo<br>(meses) | Estado | Proporción de supervivencia<br>acumulada en el tiempo |                   | Nº de eventos<br>acumulados | Nº Casos<br>restantes |
|--------------------|-------------------|--------|---|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
|                    |                   |        | Estimada  | Error<br>Standard |                             |                       |
| <434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,929  | ,069              | 1                           | 13                    |
|                    | 2                 | 1      | ,857  | ,094              | 2                           | 12                    |
|                    | 3                 | 1      | ,786  | ,110              | 3                           | 11                    |
|                    | 4                 | 1      | ,714  | ,121              | 4                           | 10                    |
|                    | 5                 | 1      | ,643  | ,128              | 5                           | 9                     |
|                    | 6                 | 1      | ,571  | ,132              | 6                           | 8                     |
|                    | 7                 | 1      | ,500  | ,134              | 7                           | 7                     |
|                    | 8                 | 0      | .   | .                 | 7                           | 6                     |
|                    | 9                 | 0      | .   | .                 | 7                           | 5                     |
|                    | 10                | 0      | .   | .                 | 7                           | 4                     |
|                    | 11                | 0      | .   | .                 | 7                           | 3                     |
|                    | 12                | 0      | .   | .                 | 7                           | 2                     |
|                    | 13                | 0      | .   | .                 | 7                           | 1                     |
|                    | 14                | 0      | .   | .                 | 7                           | 0                     |
| >434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,889  | ,105              | 1                           | 8                     |
|                    | 2                 | 1      | ,778  | ,139              | 2                           | 7                     |
|                    | 3                 | 1      | ,667  | ,157              | 3                           | 6                     |
|                    | 4                 | 1      | ,556  | ,166              | 4                           | 5                     |
|                    | 5                 | 1      | ,444  | ,166              | 5                           | 4                     |
|                    | 6                 | 1      | ,333  | ,157              | 6                           | 3                     |
|                    | 7                 | 1      | ,222  | ,139              | 7                           | 2                     |
|                    | 8                 | 1      | ,111  | ,105              | 8                           | 1                     |
|                    | 9                 | 1      | ,000  | ,000              | 9                           | 0                     |

**Tablas de supervivencia según el tamaño del tumor y la concentración de VEGF-A en suero**

**Tabla supervivencia. Tamaño <5,4 cm**

| VEGF-A (suero)  | Tiempo | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | N Casos restantes |
|-----------------|--------|--------|--|----------------|--------------------------|-------------------|
|                 |        |        | Estimada   | Error Standard |                          |                   |
| <434,93 (pg/ml) | 1      | 1      | ,941   | ,057           | 1                        | 16                |
|                 | 2      | 1      | ,882   | ,078           | 2                        | 15                |
|                 | 3      | 1      | ,824   | ,092           | 3                        | 14                |
|                 | 4      | 1      | ,765   | ,103           | 4                        | 13                |
|                 | 5      | 1      | ,706   | ,111           | 5                        | 12                |
|                 | 6      | 1      | ,647   | ,116           | 6                        | 11                |
|                 | 7      | 0      | .  | .              | 6                        | 10                |
|                 | 8      | 0      | .  | .              | 6                        | 9                 |
|                 | 9      | 0      | .  | .              | 6                        | 8                 |
|                 | 10     | 0      | .  | .              | 6                        | 7                 |
|                 | 11     | 0      | .  | .              | 6                        | 6                 |
|                 | 12     | 0      | .  | .              | 6                        | 5                 |
|                 | 13     | 0      | .  | .              | 6                        | 4                 |
|                 | 14     | 0      | .  | .              | 6                        | 3                 |
|                 | 15     | 0      | .  | .              | 6                        | 2                 |
|                 | 16     | 0      | .  | .              | 6                        | 1                 |
|                 | 17     | 0      | .  | .              | 6                        | 0                 |
| >434,93 (pg/ml) | 1      | 1      | ,833   | ,152           | 1                        | 5                 |
|                 | 2      | 1      | ,667   | ,192           | 2                        | 4                 |
|                 | 3      | 1      | ,500   | ,204           | 3                        | 3                 |
|                 | 4      | 1      | ,333   | ,192           | 4                        | 2                 |
|                 | 5      | 0      | .  | .              | 4                        | 1                 |
|                 | 6      | 0      | .  | .              | 4                        | 0                 |

**Tabla supervivencia. Tamaño >5,4 cm**

| VEGF-A (suero)  | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº Casos restantes |
|-----------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|--------------------|
|                 |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                    |
| <434,93 (pg/ml) | 1              | 1      | ,857   | ,132           | 1                        | 6                  |
|                 | 2              | 1      | ,714   | ,171           | 2                        | 5                  |
|                 | 3              | 1      | ,571   | ,187           | 3                        | 4                  |
|                 | 4              | 1      | ,429   | ,187           | 4                        | 3                  |
|                 | 5              | 1      | ,286   | ,171           | 5                        | 2                  |
|                 | 6              | 1      | ,143   | ,132           | 6                        | 1                  |
|                 | 7              | 0      | .  | .              | 6                        | 0                  |
| >434,93 (pg/ml) | 1              | 1      | ,875   | ,117           | 1                        | 7                  |
|                 | 2              | 1      | ,750   | ,153           | 2                        | 6                  |
|                 | 3              | 1      | ,625   | ,171           | 3                        | 5                  |
|                 | 4              | 1      | ,500   | ,177           | 4                        | 4                  |
|                 | 5              | 1      | ,375   | ,171           | 5                        | 3                  |
|                 | 6              | 1      | ,250   | ,153           | 6                        | 2                  |
|                 | 7              | 1      | ,125   | ,117           | 7                        | 1                  |
|                 | 8              | 1      | ,000   | ,000           | 8                        | 0                  |



**Tablas de supervivencia según la estirpe histológica y la concentración de VEGF-A en suero**

Tabla supervivencia. Adenocarcinomas

| VEGF-A (suero)  | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº Casos restantes |
|-----------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|--------------------|
|                 |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                    |
| <434,93 (pg/ml) | 1              | 1      | ,833   | ,152           | 1                        | 5                  |
|                 | 2              | 1      | ,667   | ,192           | 2                        | 4                  |
|                 | 3              | 1      | ,500   | ,204           | 3                        | 3                  |
|                 | 4              | 0      | .  | .              | 3                        | 2                  |
|                 | 5              | 0      | .  | .              | 3                        | 1                  |
|                 | 6              | 0      | .  | .              | 3                        | 0                  |
| >434,93 (pg/ml) | 1              | 1      | ,500   | ,354           | 1                        | 1                  |
|                 | 2              | 1      | ,000   | ,000           | 2                        | 0                  |

Tabla supervivencia. Epidermoides

| VEGF-A (suero)  | Tiempo | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº Casos restantes |
|-----------------|--------|--------|--|----------------|--------------------------|--------------------|
|                 |        |        | Estimada   | Error Standard |                          |                    |
| <434,93 (pg/ml) | 1      | 1      | ,909   | ,087           | 1                        | 10                 |
|                 | 2      | 1      | ,818   | ,116           | 2                        | 9                  |
|                 | 3      | 1      | ,727   | ,134           | 3                        | 8                  |
|                 | 4      | 1      | ,636   | ,145           | 4                        | 7                  |
|                 | 5      | 0      | .  | .              | 4                        | 6                  |
|                 | 6      | 0      | .  | .              | 4                        | 5                  |
|                 | 7      | 0      | .  | .              | 4                        | 4                  |
|                 | 8      | 0      | .  | .              | 4                        | 3                  |
|                 | 9      | 0      | .  | .              | 4                        | 2                  |
|                 | 10     | 0      | .  | .              | 4                        | 1                  |
|                 | 11     | 0      | .  | .              | 4                        | 0                  |
| >434,93 (pg/ml) | 1      | 1      | ,889   | ,105           | 1                        | 8                  |
|                 | 2      | 1      | ,778   | ,139           | 2                        | 7                  |
|                 | 3      | 1      | ,667   | ,157           | 3                        | 6                  |
|                 | 4      | 1      | ,556   | ,166           | 4                        | 5                  |
|                 | 5      | 1      | ,444   | ,166           | 5                        | 4                  |
|                 | 6      | 1      | ,333   | ,157           | 6                        | 3                  |
|                 | 7      | 1      | ,222   | ,139           | 7                        | 2                  |
|                 | 8      | 0      | .  | .              | 7                        | 1                  |
|                 | 9      | 0      | .  | .              | 7                        | 0                  |

Tabla supervivencia. Células Grandes

| VEGF-A (suero)  | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº Casos restantes |
|-----------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|--------------------|
|                 |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                    |
| <434,93 (pg/ml) | 1              | 1      | ,800   | ,179           | 1                        | 4                  |
|                 | 2              | 1      | ,600   | ,219           | 2                        | 3                  |
|                 | 3              | 1      | ,400   | ,219           | 3                        | 2                  |
|                 | 4              | 0      | .  | .              | 3                        | 1                  |
|                 | 5              | 0      | .  | .              | 3                        | 0                  |
| >434,93 (pg/ml) | 1              | 1      | ,500   | ,354           | 1                        | 1                  |
|                 | 2              | 1      | ,000   | ,000           | 2                        | 0                  |

Tabla supervivencia. Tumores no células pequeñas

| VEGF-A (suero)  | Tiempo (meses) | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº Casos restantes |
|-----------------|----------------|--------|--|----------------|--------------------------|--------------------|
|                 |                |        | Estimada   | Error Standard |                          |                    |
| <434,93 (pg/ml) | 1              | 1      | ,955   | ,044           | 1                        | 21                 |
|                 | 2              | 1      | ,909   | ,061           | 2                        | 20                 |
|                 | 3              | 1      | ,864   | ,073           | 3                        | 19                 |
|                 | 4              | 1      | ,818   | ,082           | 4                        | 18                 |
|                 | 5              | 1      | ,773   | ,089           | 5                        | 17                 |
|                 | 6              | 1      | ,727   | ,095           | 6                        | 16                 |
|                 | 7              | 1      | ,682   | ,099           | 7                        | 15                 |
|                 | 8              | 1      | ,636   | ,103           | 8                        | 14                 |
|                 | 9              | 1      | ,591   | ,105           | 9                        | 13                 |
|                 | 10             | 1      | ,545   | ,106           | 10                       | 12                 |
|                 | 11             | 0      | .  | .              | 10                       | 11                 |
|                 | 12             | 0      | .  | .              | 10                       | 10                 |
|                 | 13             | 0      | .  | .              | 10                       | 9                  |
|                 | 14             | 0      | .  | .              | 10                       | 8                  |
|                 | 15             | 0      | .  | .              | 10                       | 7                  |
|                 | 16             | 0      | .  | .              | 10                       | 6                  |
|                 | 17             | 0      | .  | .              | 10                       | 5                  |
|                 | 18             | 0      | .  | .              | 10                       | 4                  |
|                 | 19             | 0      | .  | .              | 10                       | 3                  |
|                 | 20             | 0      | .  | .              | 10                       | 2                  |
|                 | 21             | 0      | .  | .              | 10                       | 1                  |
|                 | 22             | 0      | .  | .              | 10                       | 0                  |
| >434,93 (pg/ml) | 1              | 1      | ,923   | ,074           | 1                        | 12                 |
|                 | 2              | 1      | ,846   | ,100           | 2                        | 11                 |
|                 | 3              | 1      | ,769   | ,117           | 3                        | 10                 |
|                 | 4              | 1      | ,692   | ,128           | 4                        | 9                  |
|                 | 5              | 1      | ,615   | ,135           | 5                        | 8                  |
|                 | 6              | 1      | ,538   | ,138           | 6                        | 7                  |
|                 | 7              | 1      | ,462   | ,138           | 7                        | 6                  |
|                 | 8              | 1      | ,385   | ,135           | 8                        | 5                  |
|                 | 9              | 1      | ,308   | ,128           | 9                        | 4                  |
|                 | 10             | 1      | ,231   | ,117           | 10                       | 3                  |
|                 | 11             | 1      | ,154   | ,100           | 11                       | 2                  |
|                 | 12             | 0      | .  | .              | 11                       | 1                  |
|                 | 13             | 0      | .  | .              | 11                       | 0                  |

Tabla supervivencia. Células Pequeñas

| VEGF-A (suero)  | Tiempo | Estado | Proporción de supervivencia acumulada en el tiempo |                | Nº de eventos acumulados | Nº Casos restantes |
|-----------------|--------|--------|--|----------------|--------------------------|--------------------|
|                 |        |        | Estimada   | Error Standard |                          |                    |
| <434,93 (pg/ml) | 1      | 1      | ,833   | ,152           | 1                        | 5                  |
|                 | 2      | 1      | ,667   | ,192           | 2                        | 4                  |
|                 | 3      | 1      | ,500   | ,204           | 3                        | 3                  |
|                 | 4      | 1      | ,333   | ,192           | 4                        | 2                  |
|                 | 5      | 0      | .  | .              | 4                        | 1                  |
|                 | 6      | 0      | .  | .              | 4                        | 0                  |
| >434,93 (pg/ml) | 1      | 1      | ,667   | ,272           | 1                        | 2                  |
|                 | 2      | 1      | ,333   | ,272           | 2                        | 1                  |
|                 | 3      | 1      | ,000   | ,000           | 3                        | 0                  |

**Tablas de supervivencia según el estadio y la concentración de  
VEGF-A en suero**

Tabla supervivencia. Estadios I-II

| VEGF-A<br>(suero)  | Tiempo<br>(meses) | Estado | Proporción de supervivencia<br>acumulada en el tiempo |                   | Nº de eventos<br>acumulados | Nº Casos<br>restantes |
|--------------------|-------------------|--------|---|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
|                    |                   |        | Estimada  | Error<br>Standard |                             |                       |
| <434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,917  | ,080              | 1                           | 11                    |
|                    | 2                 | 0      | .   | .                 | 1                           | 10                    |
|                    | 3                 | 0      | .   | .                 | 1                           | 9                     |
|                    | 4                 | 0      | .   | .                 | 1                           | 8                     |
|                    | 5                 | 0      | .   | .                 | 1                           | 7                     |
|                    | 6                 | 0      | .   | .                 | 1                           | 6                     |
|                    | 7                 | 0      | .   | .                 | 1                           | 5                     |
|                    | 8                 | 0      | .   | .                 | 1                           | 4                     |
|                    | 9                 | 0      | .   | .                 | 1                           | 3                     |
|                    | 10                | 0      | .   | .                 | 1                           | 2                     |
|                    | 11                | 0      | .   | .                 | 1                           | 1                     |
|                    | 12                | 0      | .   | .                 | 1                           | 0                     |
| >434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,500  | ,354              | 1                           | 1                     |
|                    | 2                 | 1      | ,000  | ,000              | 2                           | 0                     |

Tabla supervivencia. Estadios III-IV

| VEGF-A<br>(suero)  | Tiempo<br>(meses) | Estado | Proporción de supervivencia<br>acumulada en el tiempo |                   | Nº de eventos<br>acumulados | Nº Casos<br>restantes |
|--------------------|-------------------|--------|---|-------------------|-----------------------------|-----------------------|
|                    |                   |        | Estimada  | Error<br>Standard |                             |                       |
| <434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,938  | ,061              | 1                           | 15                    |
|                    | 2                 | 1      | ,875  | ,083              | 2                           | 14                    |
|                    | 3                 | 1      | ,813  | ,098              | 3                           | 13                    |
|                    | 4                 | 1      | ,750  | ,108              | 4                           | 12                    |
|                    | 5                 | 1      | ,688  | ,116              | 5                           | 11                    |
|                    | 6                 | 1      | ,625  | ,121              | 6                           | 10                    |
|                    | 7                 | 1      | ,563  | ,124              | 7                           | 9                     |
|                    | 8                 | 1      | ,500  | ,125              | 8                           | 8                     |
|                    | 9                 | 1      | ,438  | ,124              | 9                           | 7                     |
|                    | 10                | 1      | ,375  | ,121              | 10                          | 6                     |
|                    | 11                | 1      | ,313  | ,116              | 11                          | 5                     |
|                    | 12                | 1      | ,250  | ,108              | 12                          | 4                     |
|                    | 13                | 1      | ,188  | ,098              | 13                          | 3                     |
|                    | 14                | 0      | .   | .                 | 13                          | 2                     |
|                    | 15                | 0      | .   | .                 | 13                          | 1                     |
|                    | 16                | 0      | .   | .                 | 13                          | 0                     |
| >434,93<br>(pg/ml) | 1                 | 1      | ,929  | ,069              | 1                           | 13                    |
|                    | 2                 | 1      | ,857  | ,094              | 2                           | 12                    |
|                    | 3                 | 1      | ,786  | ,110              | 3                           | 11                    |
|                    | 4                 | 1      | ,714  | ,121              | 4                           | 10                    |
|                    | 5                 | 1      | ,643  | ,128              | 5                           | 9                     |
|                    | 6                 | 1      | ,571  | ,132              | 6                           | 8                     |
|                    | 7                 | 1      | ,500  | ,134              | 7                           | 7                     |
|                    | 8                 | 1      | ,429  | ,132              | 8                           | 6                     |
|                    | 9                 | 1      | ,357  | ,128              | 9                           | 5                     |
|                    | 10                | 1      | ,286  | ,121              | 10                          | 4                     |
|                    | 11                | 1      | ,214  | ,110              | 11                          | 3                     |
|                    | 12                | 1      | ,143  | ,094              | 12                          | 2                     |
|                    | 13                | 0      | .   | .                 | 12                          | 1                     |
|                    | 14                | 0      | .   | .                 | 12                          | 0                     |

**ANEXO IV****Genes diferencialmente expresados entre los distintos tipos de tejido, según el algoritmo de detección****GENES EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO, NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO PERITUMORAL**

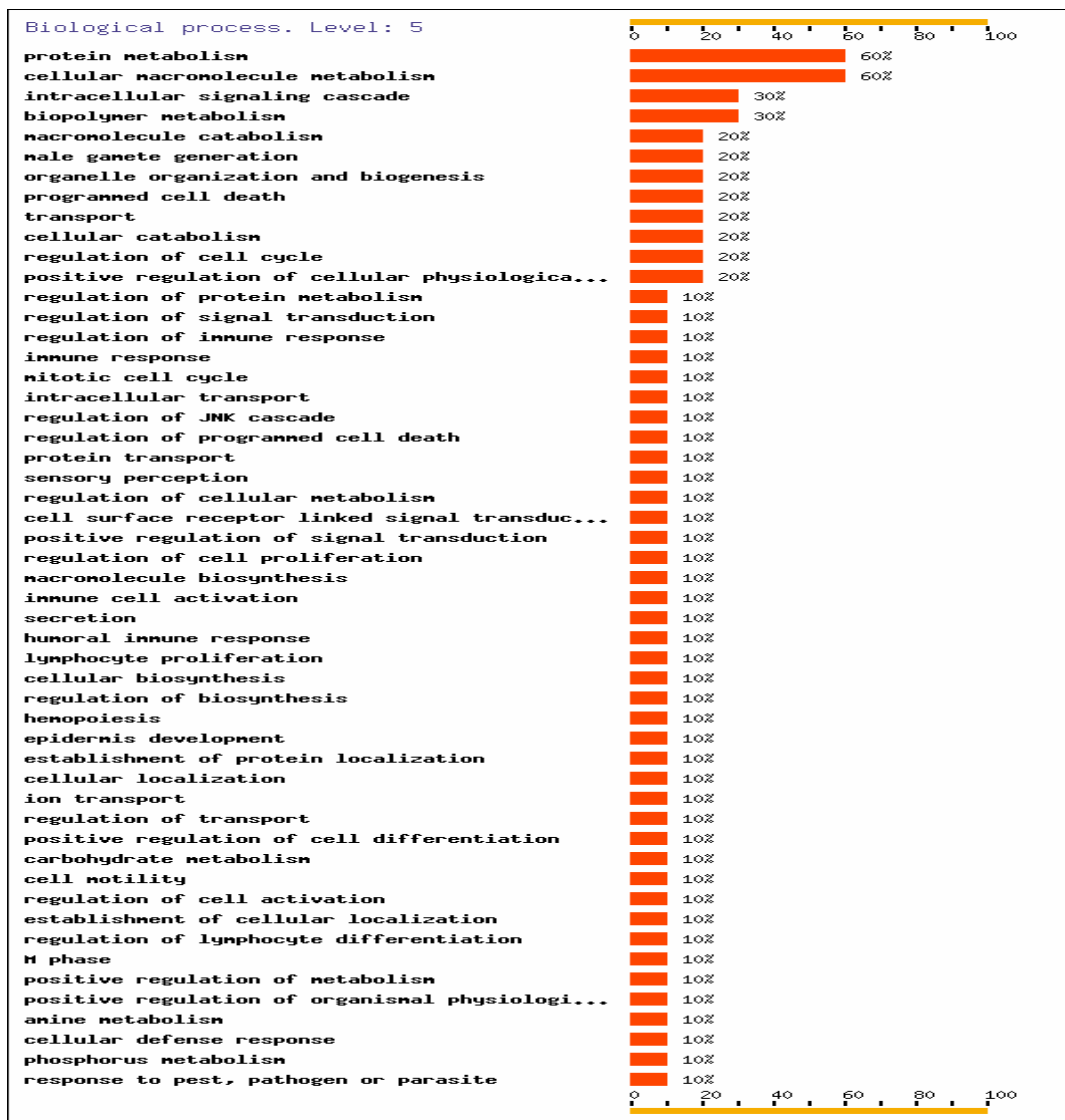
|                     |  |
|---------------------|--|
| ALDH1A2             | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2                               |
| ALOX15B             | arachidonate 15-lipoxygenase, second type                                |
| AMT                 | aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)               |
| BLZF1               | basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1)                            |
| BRAP                | BRCA1 associated protein   |
| BST1                | bone marrow stromal cell antigen 1                                       |
| C1orf21             | chromosome 1 open reading frame 21                                       |
| C1QTNF3             | C1q and tumor necrosis factor related protein 3                          |
| C8B                 | complement component 8, beta polypeptide                                 |
| CDC42BPB            | CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)                            |
| CIR                 | CBF1 interacting corepressor   |
| DBR1                | debranching enzyme homolog 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )                    |
| DEFA1 /// DEFA3     | defensin, alpha 1, myeloid-related sequence                              |
| DIRAS3              | ras homolog gene family, member I  |
| FRAG1               | FGF receptor activating protein 1  |
| GAB1                | GRB2-associated binding protein 1  |
| GOLGA8A /// GOLGA8B | golgin-67  |
| GTF3C4              | general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa                  |
| HIPK3               | homeodomain interacting protein kinase 3                                 |
| HNT                 | neurotrimin  |
| HOXB6               | homeo box B6   |
| HPN                 | hepsin (transmembrane protease, serine 1)                                |
| IL27RA              | class I cytokine receptor  |
| KCNAB1              | potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1 |
| LTBP3               | latent transforming growth factor beta binding protein 3                 |
| LZTR1               | leucine-zipper-like transcriptional regulator, 1                         |
| MYO9B               | myosin IXB   |
| NUFIP1              | nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1       |
| OMD                 | osteomodulin   |
| PAMCI               | peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase COOH-terminal interactor   |
| PDE1A               | phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent                               |
| PFKFB2              | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2                    |
| PIPOX               | pipecolic acid oxidase   |

|          |   |
|----------|---|
| PPP2R3A  | protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", alpha   |
| PTMS     | FK506 binding protein 4, 59kDa  |
| RAPGEF4  | cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II  |
| RBP4     | retinol binding protein 4, plasma   |
| RENT1    | regulator of nonsense transcripts 1   |
| RETN     | resistin  |
| RPH3AL   | rabphilin 3A-like (without C2 domains)  |
| RPS6KA5  | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide   |
| 5SLC19A3 | solute carrier family 19, member 3  |
| SLC6A4   | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4                               |
| SP2      | Sp2 transcription factor  |
| ST7      | suppression of tumorigenicity 7   |
| TWSG1    | twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)   |
| UBE2D4   | ubiquitin-conjugating enzyme HBUCE1   |
| UBTF     | upstream binding transcription factor, RNA polymerase I   |
| VIPR1    | vasoactive intestinal peptide receptor 1  |
| WISP2    | WNT1 inducible signaling pathway protein 2  |
| ZFP161   | zinc finger protein 161 homolog (mouse)   |
| ZFYVE9   | MAD, mothers against decapentaplegic homolog (Drosophila) interacting protein, receptor activation anchor |
| ZNF85    | zinc finger protein 85 (HPF4, HTF1)   |



GENES NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO, EXPRESADOS EN EL  
TEJIDO PERITUMORAL

|          |   |
|----------|---|
| ADAM28   | a disintegrin and metalloproteinase domain 28   |
| COL7A1   | collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive) |
| DUSP4    | dual specificity phosphatase 4  |
| MMP1     | matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)                                   |
| MMP12    | matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)                                       |
| PROM1    | prominin-like 1 (mouse)   |
| SULT1C1  | sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1  |
| TNFRSF21 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21                                   |
| TNFRSF7  | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7                                    |
| UBE2C    | ubiquitin-conjugating enzyme E2C  |



GENES EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO, NO EXPRESADOS EN EL  
TEJIDO TUMORAL

|          |   |
|----------|---|
| ACADL    | acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain   |
| AGER     | advanced glycosylation end product-specific receptor                                      |
| AGTR2    | angiotensin II receptor, type 2   |
| AKAP8    | A kinase (PRKA) anchor protein 8  |
| ALDH1A2  | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2  |
| ALDH5A1  | aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)         |
| ALOX15B  | arachidonate 15-lipoxygenase, second type   |
| AMT      | aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)                                |
| APOH     | apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)  |
| APRIN    | androgen-induced proliferation inhibitor  |
| AQP4     | aquaporin 4   |
| B3GALT3  | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3                          |
| BRD1     | bromodomain containing 1  |
| BST1     | bone marrow stromal cell antigen 1  |
| C11orf9  | chromosome 11 open reading frame 9  |
| C1orf21  | chromosome 1 open reading frame 21  |
| C8B      | complement component 8, beta polypeptide  |
| C9orf132 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586A0618 (from clone DKFZp586A0618)                          |
| CA4      | carbonic anhydrase IV   |
| CACNA1D  | calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit                              |
| CCRL1    | chemokine (C-C motif) receptor-like 1   |
| CD34     | CD34 antigen  |
| CDC42BPB | CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)   |
| CDH19    | cadherin 19, type 2   |
| CGI-38   | brain specific protein  |
| CHI3L2   | chitinase 3-like 2  |
| CIR      | CBF1 interacting corepressor  |
| CKB      | creatine kinase, brain  |
| CLDN18   | claudin 18  |
| CLIC3    | chloride intracellular channel 3  |
| COX10    | COX10 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein, heme A: farnesyltransferase (yeast) |
| CPB2     | carboxypeptidase B2 (plasma, carboxypeptidase U)  |
| CRYAB    | crystallin, alpha B   |
| CSF1     | colony stimulating factor 1 (macrophage)  |
| CST7     | cystatin F (leukocystatin)  |
| CXCL3    | chemokine (C-X-C motif) ligand 3  |
| CXCR6    | chemokine (C-X-C motif) receptor 6  |
| CYP27A1  | cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1                                    |



|                 |  |
|-----------------|--|
| DDX17           | DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 17, 72kDa                       |
| DEFA1 /// DEFA3 | defensin, alpha 1, myeloid-related sequence                                  |
| DKK2            | dickkopf homolog 2 ( <i>Xenopus laevis</i> )                                 |
| DNASE2          | deoxyribonuclease II, lysosomal  |
| EDN1            | endothelin 1   |
| EGFL7           | NEU1 protein   |
| ENPP4           | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative function)       |
| EPHB6           | EphB6  |
| ETFDH           | electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase                             |
| EVI5            | ---  |
| FGFR3           | fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism) |
| FGFR4           | fibroblast growth factor receptor 4  |
| FHL5            | activator of cAMP-responsive element modulator (CREM) in testis              |
| FMO5            | flavin containing monooxygenase 5  |
| FPRL1           | formyl peptide receptor-like 1   |
| FRAG1           | FGF receptor activating protein 1  |
| GAB1            | GRB2-associated binding protein 1  |
| GCN5L2          | GCN5 general control of amino-acid synthesis 5-like 2 (yeast)                |
| GPR109B         | putative chemokine receptor; GTP-binding protein                             |
| GRIA1           | H.sapiens mRNA for 5'UTR for unknown protein (clone ICRFp507O0882).          |
| HBG1 /// HBG2   | Hhemoglobin, gamma G   |
| HIGD1B          | CLST 11240 protein   |
| HIPK3           | homeodomain interacting protein kinase 3                                     |
| HLF             | hepatic leukemia factor  |
| HNT             | neurotrimin  |
| HOXD1           | homeo box D1   |
| ICAM4           | Intercellular adhesion molecule 4, Landsteiner-Wiener blood group            |
| IL18            | interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)                            |
| IL18R1          | interleukin 18 receptor 1  |
| IL18RAP         | interleukin 18 receptor accessory protein                                    |
| IL20RA          | interleukin 20 receptor, alpha   |
| IL32            | natural killer cell transcript 4   |
| ITPKB           | inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B                                      |
| KCNAB1          | potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1     |
| KCNK3           | potassium channel, subfamily K, member 3                                     |
| KCNQ1           | potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1                |
| KL              | klotho   |
| KLRB1           | killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1                       |
| KPNB1           | karyopherin (importin) beta 1  |
| LAT2            | Williams-Beuren syndrome chromosome region 5                                 |

|         |  |
|---------|--|
| LMAN1   | lectin, mannose-binding, 1   |
| LMO7    | LIM domain only 7  |
| LMOD1   | leiomodulin 1 (smooth muscle)  |
| LRP2    | low density lipoprotein-related protein 2  |
| LRRC32  | glycoprotein A repetitions predominant   |
| LY6G5C  | lymphocyte antigen 6 complex, locus G5C  |
| LZTR1   | leucine-zipper-like transcriptional regulator, 1                                   |
| MAP3K14 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14                                  |
| MIPEP   | mitochondrial intermediate peptidase   |
| MME     | membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10) |
| MMRN1   | multimerin   |
| MYO9B   | myosin IXB   |
| NDRG2   | NDRG family member 2   |
| NMB     | neuromedin B   |
| NOTCH4  | Notch homolog 4 (Drosophila)   |
| NR5A2   | nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2                                    |
| NTRK2   | neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2                                     |
| NUMB    | numb homolog (Drosophila)  |
| OGG1    | 8-oxoguanine DNA glycosylase   |
| PAFAH2  | platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kDa                                |
| PAMCI   | peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase COOH-interactor                      |
| PCDH9   | protocadherin 9  |
| PDK4    | pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4   |
| PDPN    | lung type-I cell membrane-associated glycoprotein                                  |
| PENK    | proenkephalin  |
| PFKFB2  | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2                              |
| PGC     | progastricsin (pepsinogen C)   |
| PILRA   | paired immunoglobulin-like receptor alpha  |
| PIPOX   | pipecolic acid oxidase   |
| PISD    | phosphatidylserine decarboxylase   |
| PLA1A   | phospholipase A1 member A  |
| PLA2G10 | phospholipase A2, group X  |
| PLA2G1B | phospholipase A2, group IB (pancreas)  |
| PLCB4   | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434E235 (from clone DKFZp434E235)                     |
| PLCL1   | phospholipase C-like 1   |
| PMM1    | phosphomannomutase 1   |
| PPARG   | peroxisome proliferative activated receptor, gamma                                 |
| PRKCD   | protein kinase C, delta  |
| PTEN    | phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)            |
| PTGER2  | prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa                                    |
| PTMS    | FK506 binding protein 4, 59kDa   |
| PTPRN2  | protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2                       |
| PZP     | pregnancy-zone protein   |
| RALGPS1 | Ral guanine nucleotide exchange factor RalGPS1A                                    |

|                 |  |
|-----------------|--|
| RAMP3           | receptor (calcitonin) activity modifying protein 3   |
| RAPGEF4         | cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II   |
| RASA2           | RAS p21 protein activator 2  |
| RBP4            | retinol binding protein 4, plasma  |
| REL             | v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)   |
| RENT1           | regulator of nonsense transcripts 1  |
| RETN            | resistin   |
| RGN             | regucalcin (senescence marker protein-30)  |
| RPS6KA5         | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5  |
| SCEL            | sciellin   |
| SCML1           | sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)   |
| SCN7A           | sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha polypeptide   |
| SCNN1B          | sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta (Liddle syndrome)   |
| SE57-1          | CTCL tumor antigen se57-1  |
| SELE            | selectin E (endothelial adhesion molecule 1)   |
| SEP04           | peanut-like 2 (Drosophila)   |
| SGK3            | serum/glucocorticoid regulated kinase-like   |
| SLC12A6         | solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6                                     |
| SLC15A2         | solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2  |
| SLC15A3         | peptide transporter 3  |
| SLC16A5         | solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 5                                    |
| SLC19A3         | solute carrier family 19, member 3   |
| SLC22A5         | solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5  |
| SLC25A11        | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11                        |
| SLC29A1         | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1   |
| SLC6A4          | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4                              |
| SMA3            | SMA3   |
| SMAD6           | MAD, mothers against decapentaplegic homolog 6 (Drosophila)  |
| SORBS1          | sorbin and SH3 domain containing 1   |
| SPATA2          | spermatogenesis associated 2   |
| SPTBN1          | spectrin, beta, non-erythrocytic 1   |
| SSPN            | sarcospan (Kras oncogene-associated gene)  |
| ST6GALNAC       | 5alpha-N-acetylneuraminyl 2,3-betagalactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase E |
| STAC            | src homology three (SH3) and cysteine rich domain  |
| TBX2            | T-box 2  |
| TCF21           | transcription factor 21  |
| TM7SF4          | DC-specific transmembrane protein  |
| TNNC1           | troponin C, slow   |
| TNS1            | ---  |
| TPSAB1 ///TPSB2 | tryptase, alpha  |

|        |   |
|--------|---|
| TSPAN4 | transmembrane 4 superfamily member 7  |
| TTN    | titin   |
| UBADC1 | putative glioblastoma cell differentiation-related  |
| UBE2D4 | ubiquitin-conjugating enzyme HBUCE1   |
| UST    | uronyl-2-sulfotransferase   |
| VIPR1  | vasoactive intestinal peptide receptor 1  |
| VNN2   | vanin 2   |
| WISP2  | WNT1 inducible signaling pathway protein 2  |
| XLKD1  | extracellular link domain containing 1  |
| XLKD1  | extracellular link domain containing 1  |
| ZBTB16 | zinc finger protein 145 (Kruppel-like, expressed in promyelocytic leukemia)                               |
| ZFYVE9 | MAD, mothers against decapentaplegic homolog (Drosophila) interacting protein, receptor activation anchor |
| ZNF165 | zinc finger protein 165   |

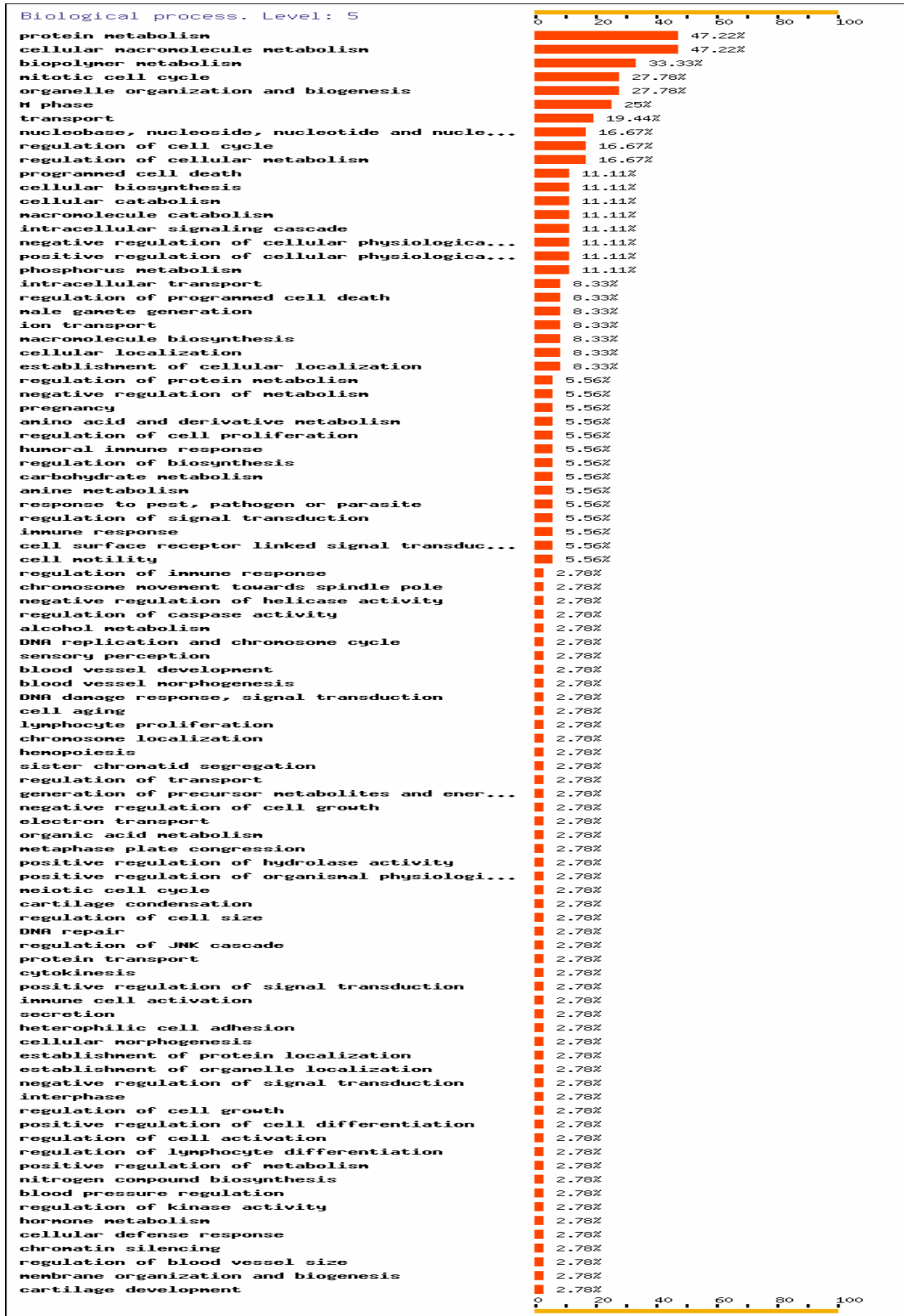


GENES NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO, EXPRESADOS EN EL  
TEJIDO TUMORAL

|           |  |
|-----------|--|
| ADAM28    | a disintegrin and metalloproteinase domain 28  |
| AGT       | angiotensinogen (serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 8) |
| ANGPT2    | angiopoietin 2   |
| BIRC5     | baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)   |
| CCNE2     | cyclin E2  |
| CDC20     | CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)   |
| CENPE     | centromere protein E, 312kDa   |
| COL10A1   | ---  |
| COL11A1   | collagen, type XI, alpha 1   |
| COL16A1   | collagen, type XVI, alpha 1  |
| DACT1     | dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin (xenopus)   |
| DIO2      | deiodinase, iodothyronine, type II   |
| DNAJC12   | J domain containing protein 1  |
| GCN5L2    | GCN5 general control of amino-acid synthesis 5-like 2 (yeast)  |
| GMDS      | GDP-mannose 4,6-dehydratase  |
| GMPPA     | GDP-mannose pyrophosphorylase A  |
| HCA112    | hepatocellular carcinoma-associated antigen 112  |
| HIST1H2BF | histone 1, H2bf  |
| HMMR      | hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)  |
| IMP-3     | IGF-II mRNA-binding protein 3  |
| MAP2K2    | mitogen-activated protein kinase kinase 2  |
| MMP1      | matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)  |
| MMP12     | matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)  |
| NEK2      | NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2  |
| PIAS4     | protein inhibitor of activated STAT protein PIASy  |
| PRC1      | protein regulator of cytokinesis 1   |
| PRSS2     | protease, serine, 2 (trypsin 2)  |
| PYCR1     | pyrroline-5-carboxylate reductase 1  |
| RGS17     | regulator of G-protein signalling 17   |
| S100A2    | S100 calcium binding protein A2  |
| SIL       | TAL1 (SCL) interrupting locus  |
| SPAG4     | sperm associated antigen 4   |
| SPAG5     | sperm associated antigen 5   |
| SPINK1    | serine protease inhibitor, Kazal type 1  |
| STK6      | serine/threonine kinase 6  |
| TNFRSF17  | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17  |
| TNFRSF21  | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21  |
| TNFRSF7   | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7   |
| TOP2A     | topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa  |
| TP53      | tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)   |
| TPX2      | chromosome 20 open reading frame 1   |
| TRIP13    | thyroid hormone receptor interactor 13   |

TTK  
 UBE2C  
 UCHL1

TTK protein kinase  
 ubiquitin-conjugating enzyme E2C  
 ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)

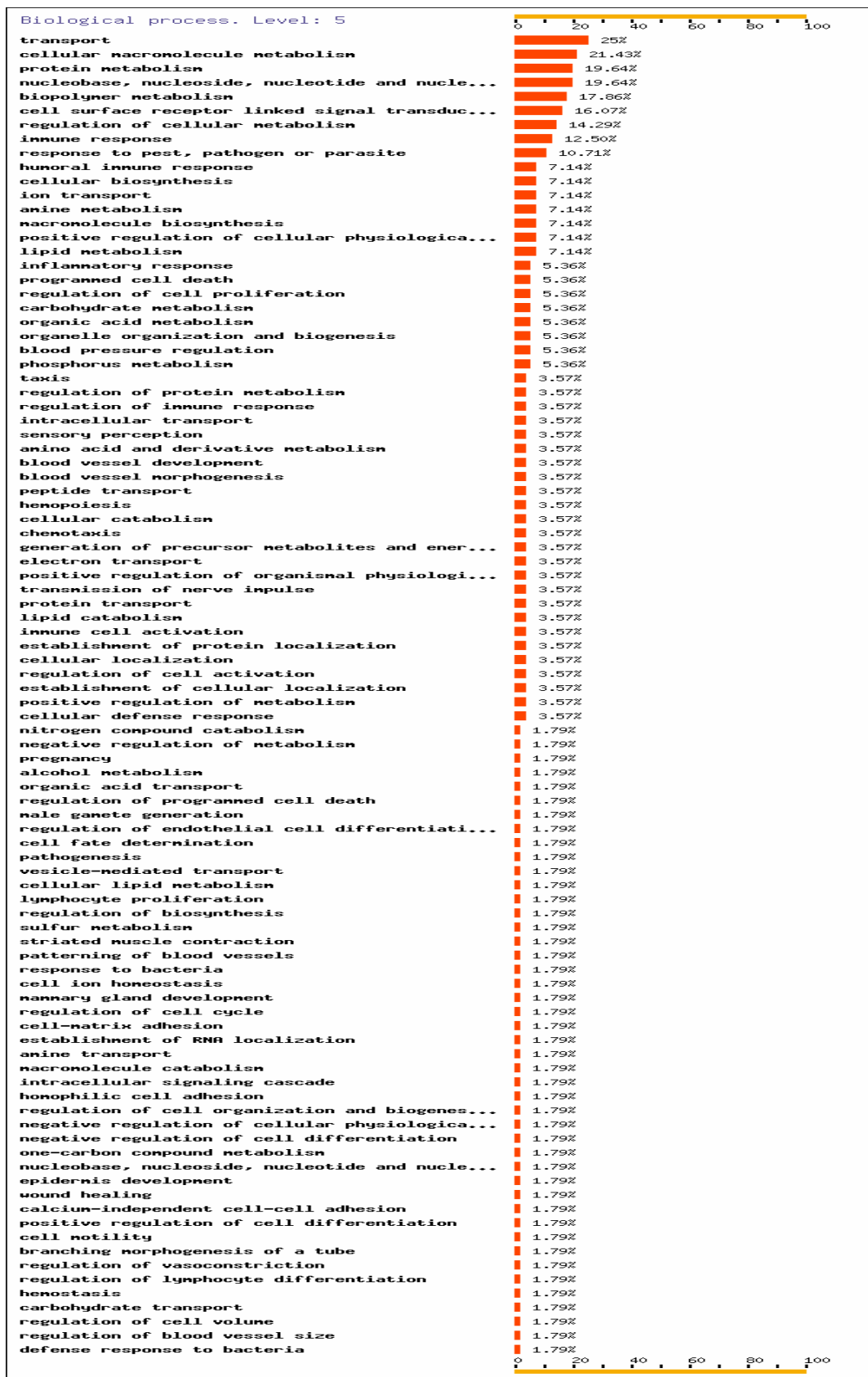


GENES EXPRESADOS EN EL TEJIDO PERITUMORAL, NO EXPRESADOS  
EN EL TEJIDO TUMORAL

|          |  |
|----------|--|
| ACADL    | acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain                        |
| AGER     | advanced glycosylation end product-specific receptor             |
| AGTR2    | angiotensin II receptor, type 2                                  |
| AQP4     | aquaporin 4  |
| BRD1     | bromodomain containing 1   |
| C9orf132 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586A0618 (from clone DKFZp586A0618) |
| CA4      | carbonic anhydrase IV  |
| CACNA1D  | calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit     |
| CCL20    | chemokine (C-C motif) ligand 20                                  |
| CD86     | CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)               |
| CHI3L2   | chitinase 3-like 2   |
| CKB      | creatine kinase, brain   |
| CLDN18   | claudin 18   |
| CLIC3    | chloride intracellular channel 3                                 |
| CPB2     | carboxypeptidase B2 (plasma, carboxypeptidase U)                 |
| CST7     | cystatin F (leukocystatin)                                       |
| CTAGE5   | meningioma expressed antigen 6 (coiled-coil proline-rich)        |
| CYP27A1  | cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1           |
| DNASE2   | deoxyribonuclease II, lysosomal                                  |
| DTNA     | dystrobrevin, alpha  |
| EDN1     | endothelin 1   |
| EPHB6    | EphB6  |
| FHL5     | activator of cAMP-responsive element modulator (CREM) in testis  |
| FPRL1    | formyl peptide receptor-like 1                                   |
| GPR109B  | putative chemokine receptor; GTP-binding protein                 |
| HAL      | histidine ammonia-lyase  |
| HNRPA1   | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1                       |
| IL18     | interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)                |
| KCNK3    | potassium channel, subfamily K, member 3                         |
| KL       | klotho   |
| KLRB1    | killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1           |
| KPNB1    | karyopherin (importin) beta 1                                    |
| LRP2     | low density lipoprotein-related protein 2                        |
| LRRC32   | glycoprotein A repetitions predominant                           |
| MMRN1    | multimerin   |
| NDRG2    | NDRG family member 2   |
| NOTCH4   | Notch homolog 4 (Drosophila)                                     |
| PCDH9    | protocadherin 9  |
| PDK4     | pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4                       |
| PGC      | progastricsin (pepsinogen C)                                     |
| PISD     | phosphatidylserine decarboxylase                                 |



|           |  |
|-----------|--|
| PLA2G10   | phospholipase A2, group X  |
| PLA2G1B   | phospholipase A2, group IB (pancreas)  |
| POLR2A    | polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa   |
| PRKCD     | protein kinase C, delta  |
| PTGER2    | prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa  |
| PZP       | pregnancy-zone protein   |
| SCEL      | sciellin   |
| SCML1     | sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)   |
| SE57-1    | CTCL tumor antigen se57-1  |
| SEP04     | peanut-like 2 (Drosophila)   |
| SLC12A6   | solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6                                     |
| SLC15A2   | solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2  |
| SLC15A3   | peptide transporter 3  |
| SLC25A11  | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11                        |
| SORBS1    | sorbin and SH3 domain containing 1   |
| SPATA2    | spermatogenesis associated 2   |
| SPTBN1    | spectrin, beta, non-erythrocytic 1   |
| ST6GALNAC | 5alpha-N-acetylneuraminyl 2,3-betagalactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase E |
| SULT1C1   | sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1   |
| TBX2      | T-box 2  |
| TCF21     | transcription factor 21  |
| TNNC1     | troponin C, slow   |
| TSPAN4    | transmembrane 4 superfamily member 7   |
| UST       | uronyl-2-sulfotransferase  |
| ZNF165    | zinc finger protein 165  |



GENES NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO PERITUMORAL, EXPRESADOS  
EN EL TEJIDO TUMORAL

|           |   |
|-----------|---|
| BIRC5     | baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)                        |
| BRAP      | BRCA1 associated protein  |
| C1QTNF3   | C1q and tumor necrosis factor related protein 3                       |
| CDC20     | CDC20 cell division cycle 20 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )         |
| CENPE     | centromere protein E, 312kDa  |
| CILP      | cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase |
| COL11A1   | collagen, type XI, alpha 1  |
| COPZ2     | coatamer protein complex, subunit zeta 2                              |
| DIO2      | deiodinase, iodothyronine, type II                                    |
| HIST1H2BF | histone 1, H2bf   |
| HOXB6     | homeo box B6  |
| PIAS4     | protein inhibitor of activated STAT protein PIASy                     |
| PRC1      | protein regulator of cytokinesis 1                                    |
| PYCR1     | pyrroline-5-carboxylate reductase 1                                   |
| RGS17     | regulator of G-protein signalling 17                                  |
| SETDB1    | SET domain, bifurcated 1  |
| STK6      | serine/threonine kinase 6   |
| TGIF2     | TGFB-induced factor 2 (TALE family homeobox)                          |
| TPX2      | chromosome 20 open reading frame 1                                    |
| TSPAN15   | transmembrane 4 superfamily member tetraspan NET-7                    |
| TTK       | TTK protein kinase  |
| UCHL1     | ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)     |



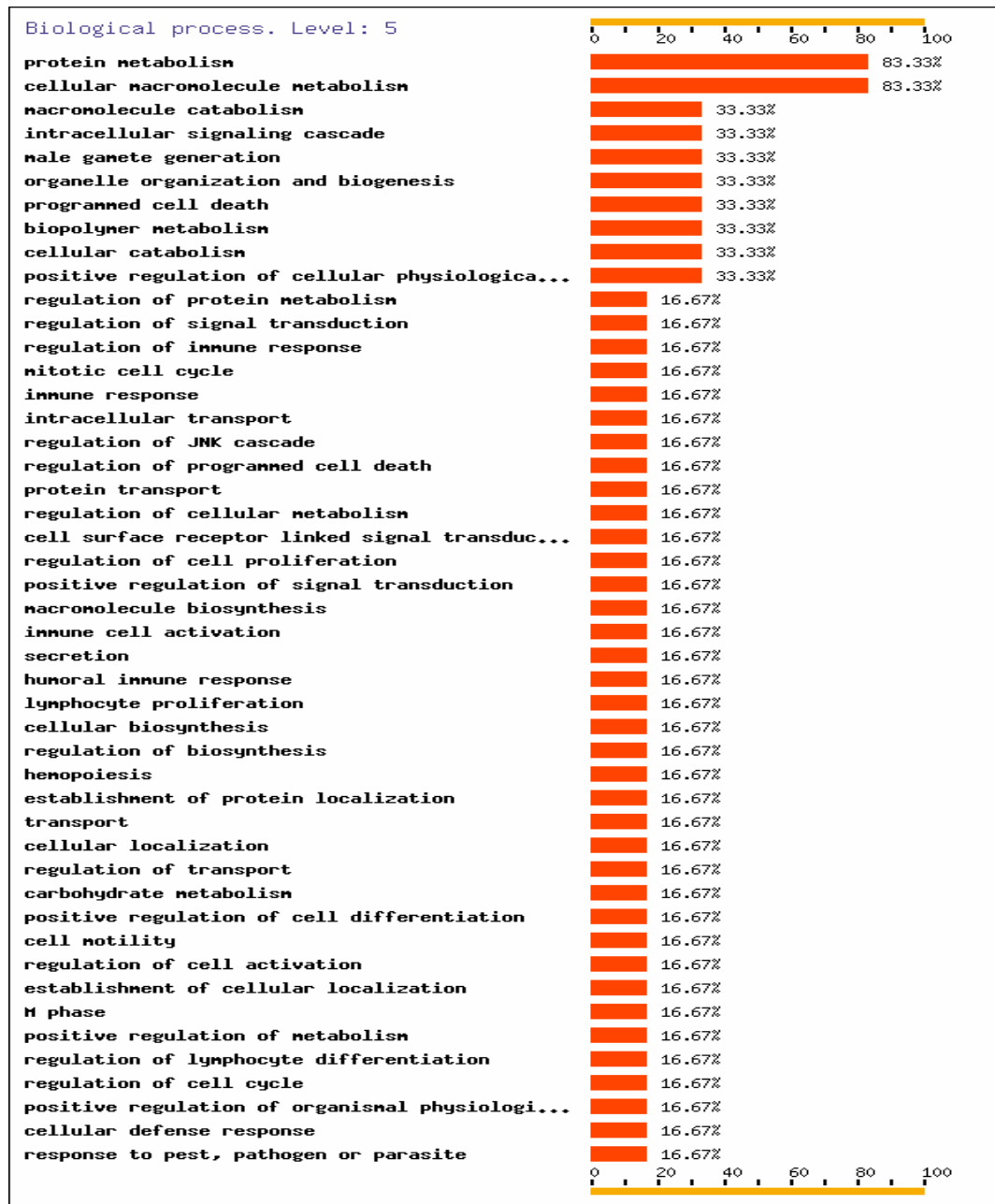
GENES EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO, NO EXPRESADOS EN EL  
TEJIDO PERITUMORAL Y TUMORAL

|                 |   |
|-----------------|---|
| ALDH1A2         | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2  |
| ALOX15B         | arachidonate 15-lipoxygenase, second type   |
| AMT             | aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)  |
| BST1            | bone marrow stromal cell antigen 1  |
| C1orf21         | chromosome 1 open reading frame 21  |
| C8B             | complement component 8, beta polypeptide  |
| CDC42BPB        | CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)   |
| CIR             | CBF1 interacting corepressor  |
| DEFA1 /// DEFA3 | defensin, alpha 1, myeloid-related sequence   |
| FRAG1           | FGF receptor activating protein 1   |
| GAB1            | GRB2-associated binding protein 1   |
| HIPK3           | homeodomain interacting protein kinase 3  |
| HNT             | neurotrimin   |
| KCNAB1          | potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1                                  |
| LZTR1           | leucine-zipper-like transcriptional regulator, 1  |
| MYO9B           | myosin IXB  |
| PAMCI           | peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase COOH-terminal interactor                                    |
| PFKFB2          | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2   |
| PIPOX           | pipecolic acid oxidase  |
| PTMS            | FK506 binding protein 4, 59kDa  |
| RAPGEF4         | cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II  |
| RBP4            | retinol binding protein 4, plasma   |
| RENT1           | regulator of nonsense transcripts 1   |
| RETN            | resistin  |
| RPS6KA5         | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5   |
| SLC19A3         | solute carrier family 19, member 3  |
| SLC6A4          | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4                               |
| UBE2D4          | ubiquitin-conjugating enzyme HBUCE1   |
| VIPR1           | vasoactive intestinal peptide receptor 1  |
| WISP2           | WNT1 inducible signaling pathway protein 2  |
| ZFYVE9          | MAD, mothers against decapentaplegic homolog (Drosophila) interacting protein, receptor activation anchor |



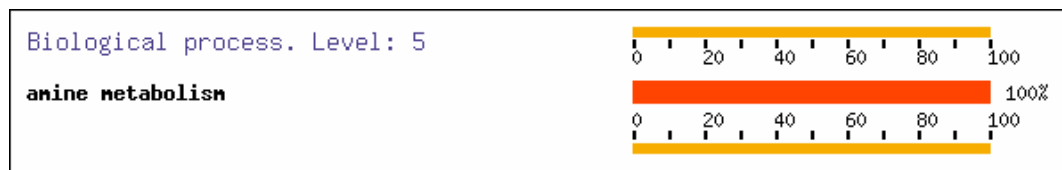
GENES NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO, EXPRESADOS EN EL  
TEJIDO PERITUMORAL Y TUMORAL

|          |   |
|----------|---|
| ADAM28   | a disintegrin and metalloproteinase domain 28         |
| MMP1     | matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) |
| MMP12    | matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)     |
| TNFRSF21 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 |
| TNFRSF7  | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7  |
| UBE2C    | ubiquitin-conjugating enzyme E2C                      |



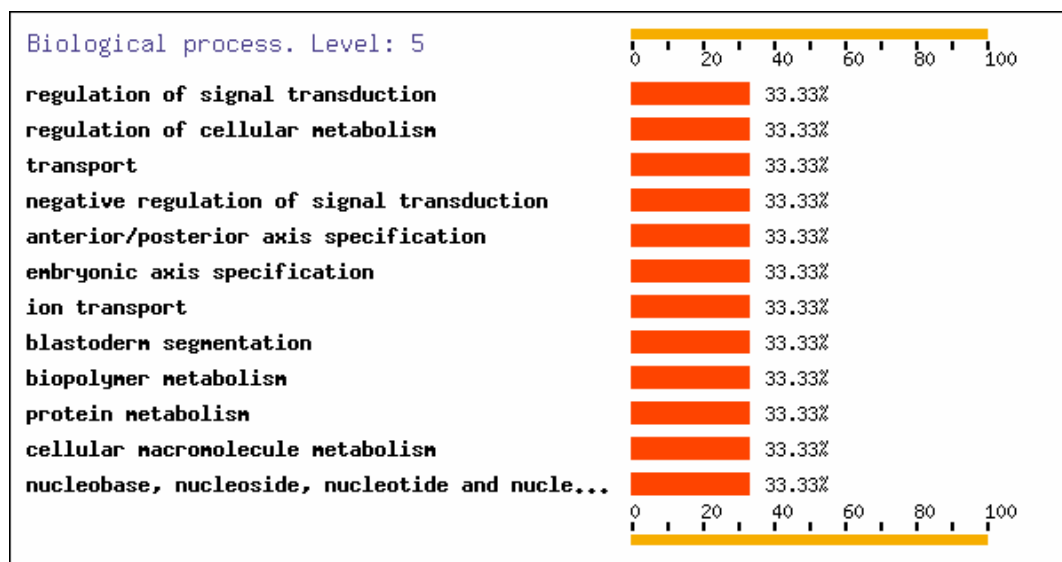
GENES EXPRESADOS EN EL TEJIDO PERITUMORAL, NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO Y TUMORAL

SULT1C1                      sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1



GENES NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO PERITUMORAL, EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO Y TUMORAL

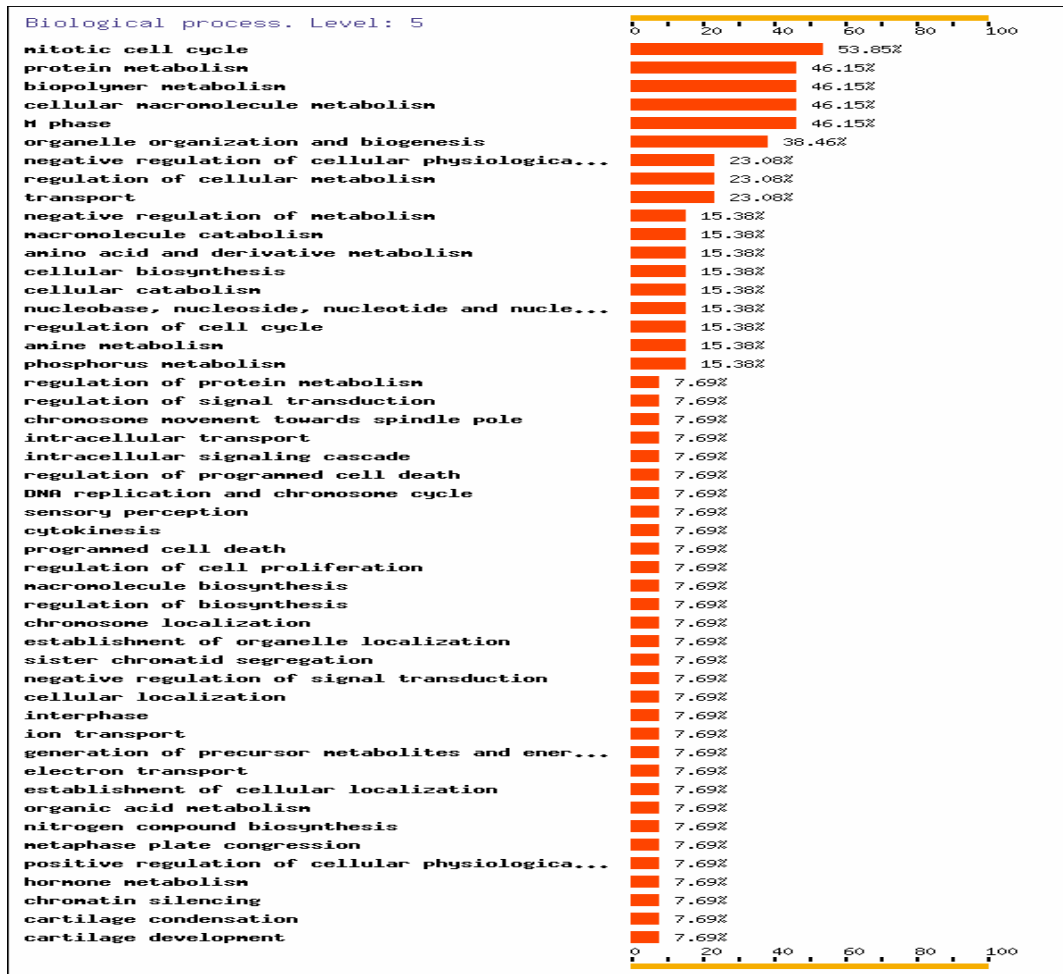
BRAP                              BRCA1 associated protein  
 C1QTNF3                      C1q and tumor necrosis factor related protein 3  
 HOXB6                              homeo box B6





GENES EXPRESADOS EN EL TEJIDO TUMORAL, NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO SANO Y PERITUMORAL

|           |   |
|-----------|---|
| BIRC5     | baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)                    |
| CDC20     | CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)              |
| CENPE     | centromere protein E, 312kDa                                      |
| COL11A1   | collagen, type XI, alpha 1  |
| DIO2      | deiodinase, iodothyronine, type II                                |
| HIST1H2BF | histone 1, H2bf   |
| PIAS4     | protein inhibitor of activated STAT protein PIASy                 |
| PRC1      | protein regulator of cytokinesis 1                                |
| PYCR1     | pyrroline-5-carboxylate reductase 1                               |
| RGS17     | regulator of G-protein signalling 17                              |
| STK6      | serine/threonine kinase 6   |
| TPX2      | chromosome 20 open reading frame 1                                |
| TTK       | TTK protein kinase  |
| UCHL1     | ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) |



GENES NO EXPRESADOS EN EL TEJIDO TUMORAL, EXPRESADOS EN  
EL TEJIDO SANO Y PERITUMORAL

|          |  |
|----------|--|
| ACADL    | acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain                        |
| AGER     | advanced glycosylation end product-specific receptor             |
| AGTR2    | angiotensin II receptor, type 2                                  |
| AQP4     | aquaporin 4  |
| BRD1     | bromodomain containing 1   |
| C9orf132 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586A0618 (from clone DKFZp586A0618) |
| CA4      | carbonic anhydrase IV  |
| CACNA1D  | calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit     |
| CHI3L2   | chitinase 3-like 2   |
| CKB      | creatine kinase, brain   |
| CLDN18   | claudin 18   |
| CLIC3    | chloride intracellular channel 3                                 |
| CPB2     | carboxypeptidase B2 (plasma, carboxypeptidase U)                 |
| CST7     | cystatin F (leukocystatin)                                       |
| CYP27A1  | cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1           |
| DNASE2   | deoxyribonuclease II, lysosomal                                  |
| EDN1     | endothelin 1   |
| EPHB6    | EphB6  |
| FHL5     | activator of cAMP-responsive element modulator (CREM) in testis  |
| FPRL1    | formyl peptide receptor-like 1                                   |
| GPR109B  | putative chemokine receptor; GTP-binding protein                 |
| IL18     | interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)                |
| KCNK3    | potassium channel, subfamily K, member 3                         |
| KL       | klotho   |
| KLRB1    | killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1           |
| KPNB1    | karyopherin (importin) beta 1                                    |
| LRP2     | low density lipoprotein-related protein 2                        |
| LRRC32   | glycoprotein A repetitions predominant                           |
| MMRN1    | multimerin   |
| NDRG2    | NDRG family member 2   |
| NOTCH4   | Notch homolog 4 (Drosophila)                                     |
| PCDH9    | protocadherin 9  |
| PDK4     | pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4                       |
| PGC      | progastricsin (pepsinogen C)                                     |
| PISD     | phosphatidylserine decarboxylase                                 |
| PLA2G10  | phospholipase A2, group X  |
| PLA2G1B  | phospholipase A2, group IB (pancreas)                            |
| PRKCD    | protein kinase C, delta  |
| PTGER2   | prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa                  |
| PZP      | pregnancy-zone protein   |
| SCEL     | sciellin   |
| SCML1    | sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)                           |

|           |  |
|-----------|--|
| SE57-1    | CTCL tumor antigen se57-1  |
| SEP04     | peanut-like 2 (Drosophila)   |
| SLC12A6   | solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6                                     |
| SLC15A2   | solute carrier family 15 (H <sup>+</sup> /peptide transporter), member 2                                 |
| SLC15A3   | peptide transporter 3  |
| SLC25A11  | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11                        |
| SORBS1    | sorbin and SH3 domain containing 1   |
| SPATA2    | spermatogenesis associated 2   |
| SPTBN1    | spectrin, beta, non-erythrocytic 1   |
| ST6GALNAC | 5alpha-N-acetylneuraminyl 2,3-betagalactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase E |
| TBX2      | T-box 2  |
| TCF21     | transcription factor 21  |
| TNNC1     | troponin C, slow   |
| TSPAN4    | transmembrane 4 superfamily member 7   |
| UST       | uronyl-2-sulfotransferase  |
| ZNF165    | zinc finger protein 165  |

