

**CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE
INTEGRINAS E DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM
NEOANGIOGÊNESE EM TUMORES COLORRETAIS
METASTÁTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO
COM BEVACIZUMABE**

TADEU FERREIRA DE PAIVA JÚNIOR

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

**Co-Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de
Souza Begmani**

Co-Orientador: Dr. Benedito Mauro Rossi

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Paiva Júnior, Tadeu Ferreira de

Correlação entre a expressão de integrinas e de proteínas envolvidas em neoangiogênese em tumores colorretais e resposta ao tratamento com Bevacizumabe / Tadeu Ferreira de Paiva Júnior - São Paulo; 2015.

183p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. NEOPLASIAS COLORRETAIS. 2. INTEGRINAS.
3. INIBIDORES DA ANGIOGÊNESE. 4. PROGNÓSTICO. 5. IMUNO-
HISTOQUÍMICA

RESUMO

Paiva Júnior TF. **Correlação entre a expressão de integrinas e de proteínas envolvidas em neoangiogênese em tumores colorretais metastáticos e resposta ao tratamento com Bevacizumabe.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: A adição do anticorpo monoclonal anti-VEGFA, bevacizumabe, a esquemas de quimioterapia contendo fluoropirimidinas está associada a aumento de taxa de resposta, de sobrevida livre de progressão e sobrevida global no tratamento de câncer colorretal metastático. Entretanto, não existem marcadores preditores de eficácia estabelecidos para uso na prática clínica até o momento. As vias associadas ao VEGF e com as integrinas estão associadas com o controle do processo de neoangiogênese e podem representar marcadores preditores de resposta. **Objetivo:** Avaliar a expressão por imuno-histoquímica de VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4, NOTCH1, integrina $\alpha 2\beta 1$, integrina $\alpha \nu \beta 3$, ILK, fosfo-FAK e PI3Kp85 em amostras do tumor colorretal (material patológico do tumor primário ou metastático) de pacientes metastáticos tratados com bevacizumabe e associação destes marcadores com taxa de resposta (TR), sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG). **Casuística e Métodos:** Foram selecionados 102 pacientes portadores de câncer colorretal metastático, tratados com quimioterapia baseada em fluoropirimidinas associadas a irinotecano ou oxaliplatina e bevacizumabe, do registro de quimioterapia do Hospital A.C. Camargo, no período de Maio/2006 a Novembro/2009, e que possuíam dados clínicos completos e blocos de parafina no arquivo da Anatomia patológica para análise. Foram coletados dados clínicos e patológicos dos pacientes e avaliada a expressão dos marcadores supracitados em cortes histológicos por imuno-histoquímica e quantificação automatizada empregando o sistema Aperio (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4, NOTCH1) ou análise visual no microscópio (integrina $\alpha 2\beta 1$, integrina $\alpha \nu \beta 3$, ILK, fosfo-FAK e PI3Kp85). **Resultados:** As seguintes variáveis clínicas estiveram estatisticamente associadas a maior TR: histologia não produtora de mucina, grau 1 e

2 (versus 3) , tumor primário localizado à esquerda e presença de metástase hepática, maior SLP: ECOG 0 ou 1 (versus 2 ou 3), tumor primário localizado à esquerda, ter sido submetido a cirurgia do tumor primário e ausência de metástase em linfonodo, e maior SG: ECOG 0 ou 1 (versus 2 ou 3), ter sido submetido a cirurgia do tumor primário, ausência de metástase em linfonodo, presença de metástase hepática, metástase sincrônica, ressecção de metástase, grau 1 e 2 (versus 3) e KRAS selvagem. Em relação aos marcadores avaliados por imuno-histoquímica, nenhum deles esteve associado a TR, enquanto a expressão de VEGFR2 no citoplasma, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK e PI3Kp85 esteve associada a maior SLP e baixa expressão de NOTCH1 membrana, expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$ e PI3K p85 com maior SG.

Conclusão: Em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia associada a bevacizumabe não houve associação entre os marcadores estudados e taxa de resposta, contudo a expressão por imuno-histoquímica, no tumor de VEGFR2, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK e PI3Kp85, esteve associada a maior sobrevida livre de progressão, enquanto que baixa expressão de NOTCH1 e a expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$ e PI3Kp85 esteve associada a maior sobrevida global.

SUMMARY

Paiva Júnior TF. [Corelation between the expression of integrins and proteins associated with angiogenesis in metastatic colorectal cancer and response to bevacizumab]. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Adding the anti-VEGFA monoclonal antibody, bevacizumab, to chemotherapy containing fluoropyrimidines improves overall response rate, progression free survival and overall survival when treating metastatic colorectal carcinoma. Nevertheless, there is not a single predictive biomarker currently. Proteins involved in the control of angiogenesis may represent interesting potetial predictive factors of response. **Objectives:** To evaluate the expression of VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4, NOTCH1, integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, ILK, FAK and PI3K in colorectal adenocarcinomas samples from patients treated with bevacizumab and their association with objective response rates (OR), progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). **Population and methods:** We analised a retrospective cohort of 102 metastatic colorectal patients, treated with fluoropyrimidine and bevacizumab based chemotherapy, in association with oxaliplatin or irinotecan, obtained from the Hospital A.C. Camargo's chemotherapy registry, from May/2006 to November/2009. Only cases with complete medical records and which had corresponding archival pathological specimens were included. Clinical and pathological data were collected and the expression of the aforementioned proteins was verified by immunohistochemistry and quantified using the Aperio automatic system or visual scoring. **Results:** Diverse clinical variables were statistically associated with OR, PFS and OS, mainly mucinous histology for OR, histologic grading for OR and OS, primary tumor location for OR and PFS, synchronous metastasis for OS, and metastasis resection for OS. The expression of VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4, NOTCH1, integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, ILK, FAK and PI3K did not associate with OR. Citoplasmatic VEGFR2, integrin $\alpha v\beta 3$, ILK and PI3K expression was associated with PFS. Integrin $\alpha 2\beta 1$, PI3K and NOTCH1 expression was associated with OS. **Conclusion:** The expression of VEGFR2, PIGF, NOTCH1, integrins $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, ILK, and PI3K on tumor cells by immunohistochemistry is associated with PFS or OS in metastatic colorectal patients treated with bevacizumab.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Proposição de Judah Folkman.....	3
Figura 2	Hipóxia induz a ativação do fator induzido por hipóxia (HIF).....	5
Figura 3	Processo da formação de um novo vaso.....	6
Figura 4	<i>Switch</i> angiogênico.....	7
Figura 5	Vias ativadas por fatores da família do VEGF.....	9
Figura 6	Interação entre VEGF, VEGFR2, DLL4 e NOTCH.....	13
Figura 6a	Via de sinalização do NOTCH e seu papel na metástase.....	14
Figura 7	Papel da sinalização DLL4 NOTCH na escolha da <i>tip cell e stalk cells</i>	16
Figura 8	DLL4 NOTCH1 na angiogênese.....	17
Figura 9	Integrinas envolvidas na angiogênese e seus ligantes mais comuns.	19
Figura 10	Estrutura, ativação e sinalização das integrinas.....	21
Figura 11	Influência das integrinas na neoangiogênese.....	22
Figura 12	Ativação e sinalização de ILK.....	24
Figura 13	A figura mostra os alvos da ação do bevacizumabe (VEGFA), aflibercept (VEGFA, VEGFB e PlGF) e regorafenibe (tirosina quinase do VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3).....	32

Figura 14	Mecanismo de ação antiangiogênica. Hipótese da normalização da vasculatura tumoral.....	32
Figura 15	Anticorpo ramucirumabe contra o domínio externo do VEGFR2....	39
Figura16	Regulação da angiogênese por VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4, NOTCH e PI3K.....	55
Figura17	Regulação da angiogênese por VEGFR2, integrinas, FAK e PI3K..	55
Figura18	Regulação da angiogênese por integrinas, ILK e PI3K.....	56
Figura 19	Fluxograma com a seleção dos pacientes no grupo controle.....	63
Figura 20a	Processo da escolha do material anátomo patológico até a montagem do TMA.....	65
Figura 20b	Exemplo de lâmina de TMA.....	66
Figura 21	Fluxograma com a seleção dos pacientes no grupo casos.....	79
Figura 22	Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) da amostra global (N=102 pacientes).....	86
Figura 23	Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) conforme características clínicas.....	87
Figura 24	Sobrevida global (SG) da amostra global (N=102 pacientes).....	88
Figura 25	Sobrevida global (SG) conforme as características clínicas.....	89
Figura 26	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme expressão de	94

	marcadores.....	
Figura 27	Sobrevida global (SG) conforme expressão de marcadores.....	95
Figura 28	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme expressão de VEGFR2 membrana e NOTCH1.....	96
Figura 29	Sobrevida global (SG) conforme expressão de VEGFR2 membrana e NOTCH1.....	96
Figura 30	Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) da amostra de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha (N=71 pacientes).....	107
Figura 31	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme as características clínicas de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	108
Figura 32	Sobrevida global (SG) da amostra de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha (N=71 pacientes).....	109
Figura 33	Sobrevida global (SG) conforme as características clínicas de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	109
Figura 34	Sobrevida global (SG) conforme expressão de marcadores entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	113
Figura 35	Sobrevida global (SG) conforme expressão de VEGFR2 na membrana e NOTCH1.....	114
Figura 36	Fluxograma com a seleção dos pacientes no grupo de validação.....	116
Figura 37	Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) da amostra de	121

	pacientes do grupo de validação (N=31 pacientes).....	
Figura 38	Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) conforme características clínicas dos pacientes do grupo de validação.....	122
Figura 39	Sobrevida global (SG) da amostra de pacientes do grupo de validação (N=31 pacientes).....	123
Figura 40	Sobrevida global (SG) conforme características clínicas dos pacientes do grupo de validação.....	124
Figura 41	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme expressão dos marcadores entre os pacientes do grupo de validação.....	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fatores angiogênicos circulantes como biomarcadores preditivos de eficácia do bevacizumabe em câncer colorretal.....	49
Quadro 2	Fatores angiogênicos circulantes com mudança na expressão durante o tratamento com bevacizumabe em câncer colorretal	50
Quadro 3	Biomarcadores <i>in situ</i> no tumor ou no estroma preditivos da eficácia ao tratamento com bevacizumabe.....	51
Quadro 4	Marcadores genéticos como biomarcadores preditivos de eficácia ao tratamento com bevacizumabe.....	52
Quadro 5	Características e especificações dos anticorpos utilizados.....	69
Quadro 6	<i>Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status..</i>	75
Quadro 7	Graduação da hipertensão.....	75
Quadro 8	Critérios para resposta definidos pelo RECIST 1.1.....	76
Quadro 9	Associação entre os marcadores imuno histoquímicos.....	98
Quadro 10	Associação entre os marcadores imuno histoquímicos entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	115
Quadro 11	Associação entre os marcadores na amostra de pacientes do grupo de validação.....	127
Quadro 12	Resumo dos resultados no grupo casos.....	128

Quadro 13	Comparação dos resultados da correlação da SLP e SG com os marcadores entre grupo casos, subgrupo casos tratados em primeira linha e grupo de validação.....	129
------------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas, demográficas e de tratamento.....	81
Tabela 2	Associação da resposta objetiva com as variáveis clínicas e patológicas.....	84
Tabela 3	Mediana dos resultados positivos (ver definição em metodologia) para marcadores com leitura digital realizada no Aperio.....	90
Tabela 4	Percentual de casos positivos (ver definição em metodologia) para marcadores com análise visual no microscópio.....	91
Tabela 5	Associação entre marcadores e características clínicas e patológicas.....	92
Tabela 6	Associação da resposta objetiva com os marcadores imuno histoquímicos.....	93
Tabela 7	Regressão logística mostrando variáveis que se mostraram associadas com taxa de resposta objetiva de maneira independente.....	99
Tabela 8	Análise multivariada para sobrevida livre de progressão.....	100
Tabela 9	Análise multivariada mostrando variáveis que se mostraram associadas com sobrevida global (SG) de maneira independente.....	101
Tabela 10	Características clínicas, demográficas e de tratamento dos pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	104
Tabela 11	Associação da resposta objetiva com as variáveis clínicas e patológicas nos pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	106

Tabela 12	Mediana dos resultados positivos (ver definição em metodologia) para marcadores com leitura digital realizada no Aperio entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	110
Tabela 13	Percentual de casos positivos (ver definição em metodologia) para marcadores com análise visual no microscópio entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	111
Tabela 14	Associação entre marcadores e características clínicas e patológicas entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.....	112
Tabela 15	Características clínicas, demográficas e de tratamento dos pacientes do grupo de validação.....	118
Tabela 16	Associação da Resposta Objetiva com as Variáveis Clínicas.....	120
Tabela 17	Associação da resposta objetiva com os marcadores imuno histoquímicos entre os pacientes do grupo de validação.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

5FU	5-fluorouracil
AJCC	do inglês American Joint Committee on Cancer
AKT	proteína quinase também conhecida como PKB, do inglês protein kinase B
Ang	angiopoietina
ANG2	angiopoietina 2
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BAD	proteína pró apoptose, membro da família bcl2
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
BRAF	oncogene responsável pela proteína quinase serina/treonina B-Raf
BSA	albumina bovina
CAPOX	capecitabina e oxaliplatina
CCR	Câncer colorretal
CD31	glicoproteína transmembrana; molécula de adesão celular plaqueta-endotélio
CEC	células endoteliais circulantes
CEP	células endoteliais progenitoras
CID10	Classificação internacional de doenças
CID10 C18	Neoplasia maligna do cólon
CID10 C20	Neoplasia maligna do reto
c-KIT	oncogene
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CXCR1	receptor de quimocinas
CXCR2	receptor de quimocinas
CXCR4	receptor de quimocinas
DAB	Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DE	doença estável
DLL1	ligante do NOTCH, do inglês delta-like 1
DLL3	ligante do NOTCH, do inglês delta-like 3

DLL4	ligante do NOTCH, do inglês delta-like 4
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECOG	classificação da performance status do Eastern Cooperative Oncology Group.
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK	do inglês extracellular-signal-regulated kinases
FAK	Quinase de adesão focal, do inglês focal adhesion kinase
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FLOX	oxaliplatina, fluorouracil em bolus e leucovorin
FOLFIRI	irinotecano, fluorouracil em bolus e infusão contínua e leucovorin
FOLFOX	oxaliplatina, fluorouracil em bolus e infusão contínua e leucovorin
FOLFOXIRI	oxaliplatina, irinotecano, fluorouracil em bolus e infusão contínua e leucovorin
FZD	receptores frizzled
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
H2O2	água oxigenada
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HE	hematoxilina-eosina
HER2	membro da família do EGFR, codificado pelo oncogene ERBB2
HGF	fator de crescimento de hepatócito
HIF	Fator induzido por hipóxia, do inglês hypoxia induced factor
HR	Hazard ratio
IFL	irinotecano, fluorouracil em bolus e leucovorin
IL	Interleucina
ILK	Quinase acoplada a integrina, do inglês integrin-linked kinase
IROX	irinotecano e oxaliplatina
JAGGED 1 ou JAG1	ligante do NOTCH

JAGGED 2 ou JAG2	ligante do NOTCH
KIT	oncogene
KRAS	oncogene humano relacionado ao RAS
MAPK	proteína quinase do inglês mitogen-activated protein kinase
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	do inglês mammalian target of rapamycin
NaN3	azida sódica
NOTCH	codifica o receptor transmembrana NOTCH
NOTCH1	receptor 1 da família NOTCH
NOTCH2	receptor 2 da família NOTCH
NOTCH3	receptor 3 da família NOTCH
NOTCH4	receptor 4 da família NOTCH
NRARP	do inglês NOTCH-regulated ankyrin repeat protein
NRAS	oncogene humano relacionado ao RAS
NRP1	neuropilina 1
NRP2	neuropilina 2
NTC	Número total de células analisadas
pAKT	fosfo-AKT
PBS	phosphate buffered saline
PCR	reação em cadeia da polimerase
PD	progressão de doença
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PDGFR	receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR-BB	receptor do fator de crescimento derivado da plaqueta BB
PDGFRβ	receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo beta
PET-CT	tomografia por emissão de pósitrons associado a tomografia computadorizada
PH	Domínio de homologia com plequistrina
PI(3,4,5)P3	PI-3,4,5-trifosfato
PI3K	do inglês phosphoinositide 3-kinase
PI3K	p110 α , p110 β e p110 δ subunidades catalíticas da PI3K

PI3K p85α	subunidade regulatória da PI3K
PI3KCA	gene que codifica a subunidade catalítica p110 α
PKC	família de proteína quinase
PLCγ	oncogene PLC γ
PIGF	Fator de crescimento placentário
PTEN	gene supressor de tumor PTEN - do inglês phosphatase and tensin homolog
RAS	oncogene humano RAS
RC	resposta completa
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RET	oncogene que codifica receptor de tirosina quinase para membros da família GDNF, do inglês rearranged during transfection
RP	resposta parcial
RTKs	Receptores de tirosina-quinases
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SAME	serviço de arquivo médico
SDF1	fator 1 derivado do estroma
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
SNPs	polimorfismos de nucleotídeo único
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SRC	oncogene SRC
TAF	Fator de angiogênese tumoral, do inglês Tumor-angiogenesis factor
TIE2	receptor de superfície celular da angiopoietina
TMA	Tissue microarray
TNF	Fator de necrose tumoral
TNM	sistema de estadiamento Tumor-node-metastasis
TP53	gene supressor de tumor TP53
TR	Taxa de resposta
TRO	taxa de resposta objetiva

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFB	Fator de crescimento endotelial vascular B, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor B
VEGFC	Fator de crescimento endotelial vascular C, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor C
VEGFD	Fator de crescimento endotelial vascular D, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor D
VEGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
VEGFR2	Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VEGFR3	Receptor 3 do fator de crescimento endotelial vascular, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
VHL	gene supressor de tumor von Hippel-Lindau
WNT	codifica proteína WNT que liga-se a receptores Frizzled na superfície celular
XELOX	capecitabina e oxaliplatina

INDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer Colorretal: Características Epidemiológicas.....	1
1.2	O Processo de Angiogênese.....	3
1.3	Proteínas e Vias Envolvidas com a Angiogênese e Papel Prognóstico no Câncer Colorretal.	7
1.3.1	Família VEGF.....	7
1.3.2	Via de sinalização NOTCH e WNT.....	12
1.4	Papel das Integrinas, e de Proteínas Envolvidas na sua Sinalização, na angiogênese e como fator Prognóstico em Câncer Colorretal	19
1.4.1	Integrinas.....	19
1.4.2	ILK.....	24
1.4.3	FAK.....	25
1.4.4	PI3K.....	26
1.5	Tratamento do Câncer Colorretal com Ênfase na Angiogênese	29
1.5.1	Principais drogas antiangiogênicas em câncer colorretal	30
1.6	Análise de Marcadores Envolvidos com Angiogênese como Prognósticos ou Preditores de Eficácia da Terapia Antiangiogênica com Bevacizumabe.....	42
1.6.1	Marcadores clínicos	42
1.6.2	Marcadores biológicos	43
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	54
3	OBJETIVOS	57
3.1	Objetivo Primário.....	57
3.2	Objetivos Secundários.....	57
4	METODOLOGIA	59
4.1	Tipo de Estudo	59
4.2	Casuística	59

4.2.1	Seleção dos Pacientes.....	59
4.2.2	Grupos de pacientes	60
4.3	Rastreamento e Separação de Lâminas e Blocos	61
4.3.1	Grupo Casos	61
4.3.2	Grupo Controle	62
4.3.3	Grupo de Validação	63
4.4	Construção dos Tissue Microarrays (TMAs).....	64
4.5	Protocolo de Reações de Imuno-Histoquímica.....	66
4.6	Análise da Marcação	70
4.6.1	Análise por Imagem Digital.....	70
4.6.2	Definições	71
4.7	Análise Visual no Microscópio.....	72
4.7.1	Definições	73
4.8	Dados Clínicos Coletados	74
4.8.1	CrITÉrios de Avaliação de Hipertensão.....	75
4.8.2	CrITÉrios de Resposta	76
4.9	Definição dos Desfechos de Sobrevida.....	76
4.10	Análise Estatística	77
5	RESULTADOS.....	79
5.1	Grupo Casos	79
5.1.1	Características Clínicas e Demográficas.....	79
5.1.2	Desfechos Clínicos.....	83
5.1.3	Análise da Influência da Expressão de Marcadores Imuno-Histoquímicos	89
5.1.4	Regressão Logística para Resposta Objetiva	99
5.1.5	Correlação de KRAS com Características Patológicas e Desfecho	99
5.1.6	Análise do Material Anátomo-Patológico Oriundo do Tumor Primário Versus de Metástase.....	100
5.1.7	Análise dos Pacientes que Receberam Bevacizumabe em Primeira Linha de Tratamento	102
5.1.8	Análise do Material Anátomo-Patológico Oriundo do Tumor Primário Versus de Metástase.....	102

5.1.9	Análise dos Pacientes que Receberam Bevacizumabe em Primeira Linha de Tratamento	103
5.2	Grupo de Validação	116
5.2.1	Características Clínicas e Demográficas	116
5.2.2	Desfechos Clínicos.....	119
5.2.3	Análise da Influência da Expressão de Marcadores Imuno-Histoquímicos	124
5.3	Resumo dos Resultados	128
6	DISCUSSÃO.....	130
7	CONCLUSÃO.....	156
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Resumo de parte do trabalho apresentado em forma de poster no congresso da American Society of Clinical Oncology- ASCO em 2013.

Anexo 3 Artigo, com resultados parciais do trabalho, submetido a revista BMC Cancer

Anexo 4 Bulas dos anticorpos utilizados.

Anexo 5 Fotos representativas das reações e marcações de imuno-histoquímica.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

O câncer colorretal (CCR) é uma doença comum e letal. No Brasil, estimou-se que, em 2014, o CCR seria o terceiro tipo de câncer mais frequente (excetuando-se câncer de pele não melanoma) em homens e o segundo mais frequente em mulheres, representando 5,0% e 6,4% do total, respectivamente (Ministério da Saúde 2014).

Nos Estados Unidos da América, são estimados cerca de 132.700 casos novos por ano e, aproximadamente, 49.700 pacientes falecem por ano devido ao CCR, sendo este responsável por 8% de todas as mortes por câncer (SIEGEL et al. 2015).

No mundo, o CCR se configura como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres, com uma estimativa de 1,2 milhões de casos novos e 608.700 óbitos para o ano de 2008. Cerca de 60% dos casos ocorrem em regiões mais desenvolvidas. Os padrões geográficos são bem semelhantes em relação ao sexo, sendo que a doença apresenta maior incidência no sexo masculino na maioria das populações (JEMAL et al. 2011).

A idade é o principal fator de risco para desenvolvimento do CCR, sendo que 90% dos casos ocorrem após os 50 anos de idade. Outros fatores de risco são: síndromes hereditárias, doença inflamatória intestinal, adultos que receberam radioterapia abdominal por câncer infantil, radioterapia para câncer de próstata,

histórico de transplante renal, alcoolismo, obesidade, tabagismo e ingestão de carne vermelha. Embora o risco individual seja maior para pessoas com susceptibilidade hereditária, a maioria dos casos ocorre de forma esporádica (CHAN e GIOVANNUCCI 2010).

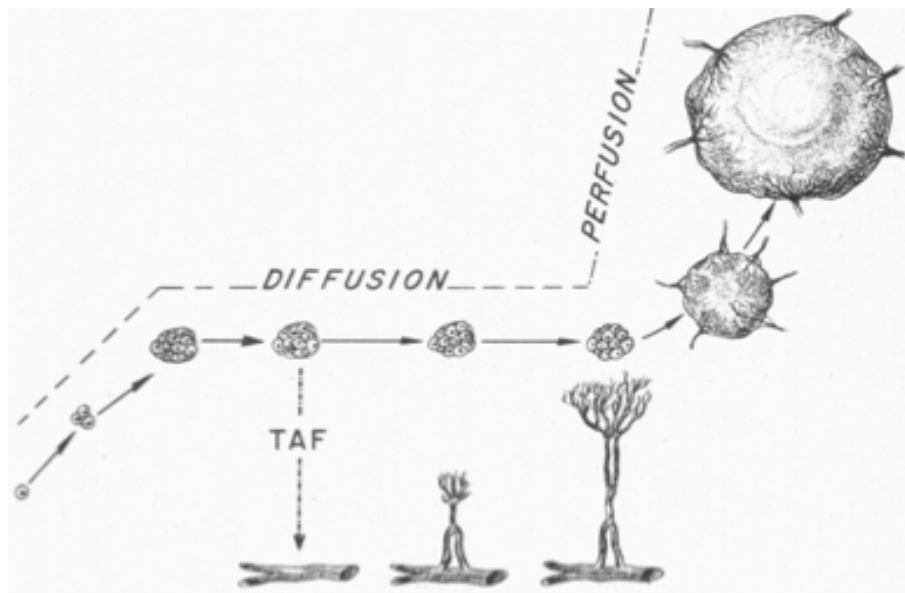
Dados americanos relatam que 20% dos pacientes apresentam-se com metástase ao diagnóstico e 50% dos pacientes com doença localizada ao diagnóstico irão apresentar recidiva durante o seguimento, de tal forma que, no total, 60% dos pacientes com CCR irão apresentar metástase em algum momento da evolução (SIEGEL et al. 2012).

Segundo a 7ª edição do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, a sobrevida global em 5 anos dos pacientes com CCR metastático, não selecionados, é em torno de 5% (EDGE et al. 2010).

A angiogênese é um dos fatores mais importantes relacionados à progressão e ao crescimento tumoral e com mecanismos de metástase, sendo considerado um dos marcos do processo de carcinogênese. Além disso, está associada em vários modelos com maior agressividade tumoral. Isso adquire maior importância pelo fato de hoje existirem várias terapias empregadas no tratamento do câncer cujo alvo é o processo de neoangiogênese (HANAHAN e WEINBERG 2011; CLARKE et al. 2014).

1.2 O PROCESSO DE ANGIOGÊNESE

Desde a proposição de Paget da teoria da semente e solo, há cerca de um século, fala-se da importância da formação de vasos para o crescimento tumoral e para formação de metástases (PAGET 1889). Mas foi em 1971 que Judah Folkman demonstrou a presença de um fator de angiogênese tumoral (TAF) e lançou a hipótese que o TAF seria um alvo terapêutico interessante, pois a sua inibição poderia evitar crescimento tumoral e, desde então, essa área de pesquisa tem evoluído exponencialmente (FOLKMAN 1971) (Figura 1).

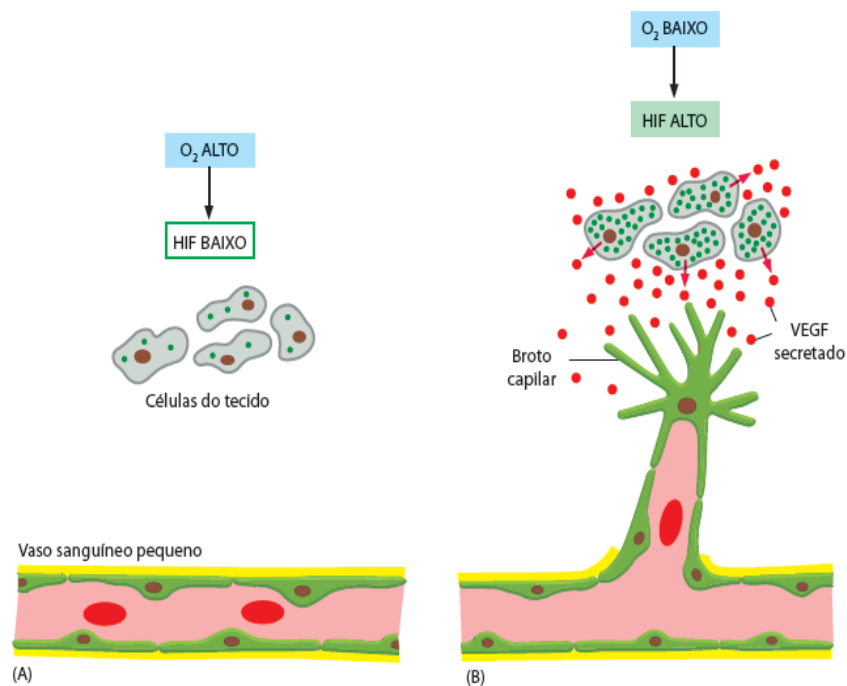


Fonte: FOLKMAN (1971).

Figura 1 - Proposição de Judah Folkman. A vascularização é necessária para o crescimento tumoral e o fator de angiogênese tumoral (TAF) poderia ser o mediador da neovascularização.

Em 1989, o grupo de Ferrara isolou e clonou o DNA do *Vascular Endothelial Growth Factor*-VEGF (LEUNG et al. 1989). Em 1992, o grupo identificou o primeiro receptor para o VEGF, o *Vascular Endothelial Growth Factor receptor 1*-VEGFR1 (FERRARA et al. (2003).

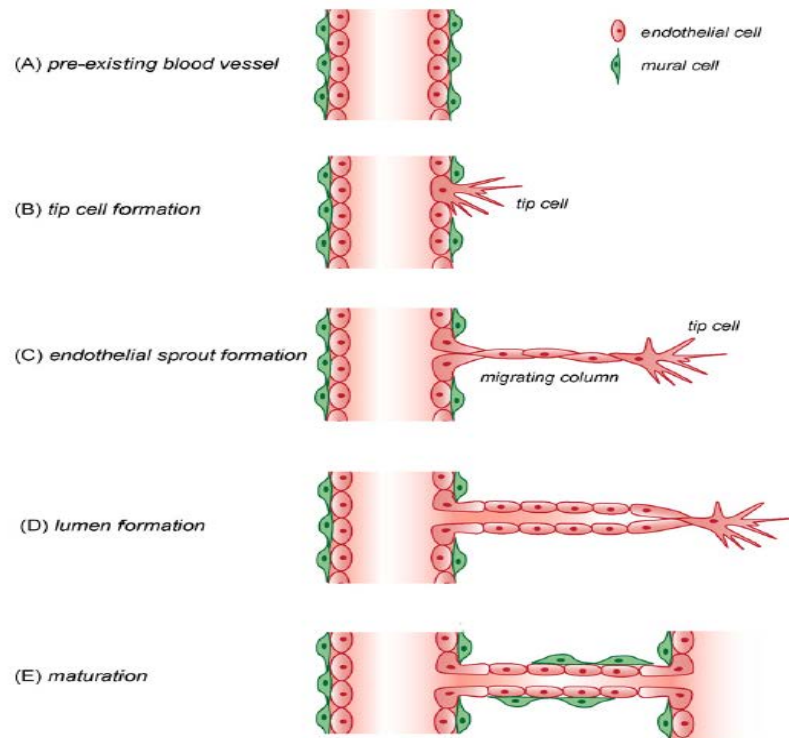
Um tumor que mede entre 1-2mm pode permanecer dormente e avascular por tempo indeterminado. Entretanto, a depender da agressividade tumoral, do microambiente e de fatores imunes do hospedeiro, a partir do momento que o tumor recebe sinais para crescer ou metastatizar ele necessitará de novos vasos. Quando o tumor é avascular ou apresenta uma quantidade pequena de vasos sanguíneos e começa a crescer, ele ficará num ambiente de hipóxia relativa, que por sua vez induz a ativação do fator induzido por hipóxia, *Hypoxia induced factor*-HIF, e esse estimula a produção de VEGF. Um aumento na concentração de VEGF próximo ao tumor criará um gradiente de VEGF, que será percebido pelas células endoteliais de vasos adjacentes já formados (Figura 2).



Fonte: ALBERTS et al. (2010a b c d).

Figura 2 - Hipóxia induz a ativação do fator induzido por hipóxia (HIF). O HIF estimula a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Este se difunde na matriz extracelular e cria um gradiente que atrai e induz a proliferação de células endoteliais de vasos adjacentes.

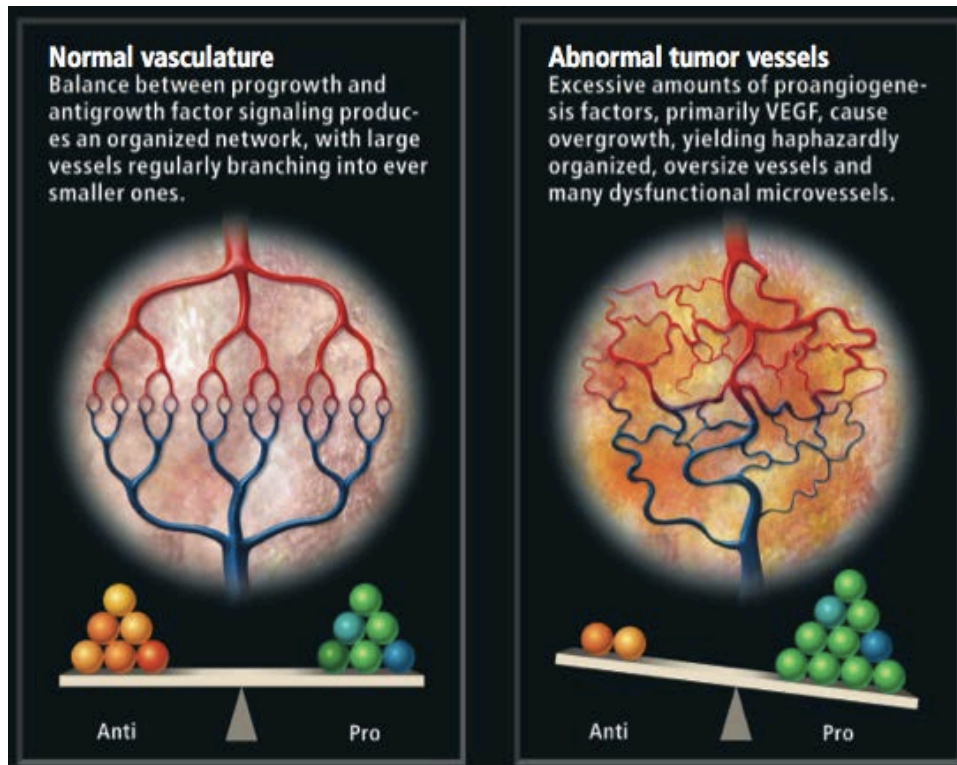
Dessa forma, a *tip cell*, uma célula endotelial especializada presente na camada de células endoteliais dos vasos, irá secretar proteases com capacidade de degradar a membrana basal e proteínas do microambiente, permitindo à *tip cell* mover-se para fora do vaso maduro e formar uma coluna migratória de células endoteliais em direção ao gradiente do fator pró-angiogênico e, posteriormente, a formação de um novo vaso que irá se comunicar com o tumor (Figura 3).



Fonte: FRANCAVILLA et al. (2009).

Figura 3 - Processo da formação de um novo vaso. O gradiente de VEGF na matriz extracelular em direção ao tumor induzem a ativação de células endoteliais especializadas (*tip cells*) que promovem a formação de uma coluna de células migratórias (*stalk cells*) em direção ao gradiente de fator pró-angiogênico. Posteriormente, ocorre a formação de um lúmen no interior desta coluna de células e a maturação do novo vaso sanguíneo.

Essa mudança do padrão de vascularização, ou *switch* angiogênico, ocorre quando os fatores pró-angiogênicos (como VEGF, PDGF, bFGF, TNF, G-CSF, PlGF, IL8, angiopoietina, entre outros) predominam em relação aos anti-angiogênicos (endostatina, trombospondina, tumstatina, troponina, interferon, IL12, IL18, angiostatina, anti-trombina III, por exemplo) (NYBERG et al. 2005; JAIN 2013) (Figura 4).



Fonte: JAIN (2013).

Figura 4 - Switch angiogênico. A mudança no padrão de formação e proliferação de novos vasos em situações fisiológicas (reparo tecidual) ou patológicas (câncer) depende da relação dinâmica entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos.

1.3 PROTEÍNAS E VIAS ENVOLVIDAS COM A ANGIOGÊNESE E PAPEL PROGNÓSTICO NO CÂNCER COLORRETAL.

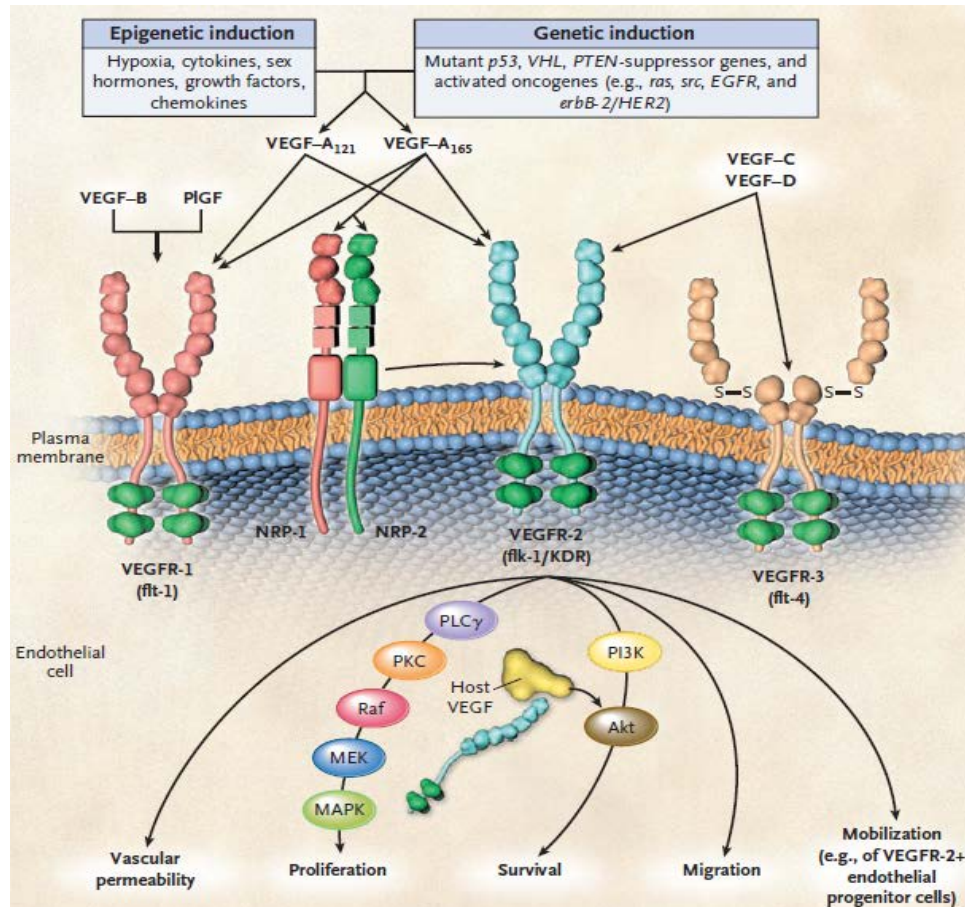
1.3.1 Família VEGF

Do ponto de vista molecular, após a ocorrência de uma indução epigenética por hipóxia e aumento do HIF (como citado acima), citocinas, hormônios sexuais, fatores de crescimento ou indução genética, como mutação de genes supressores (*TP53*, *VHL*, *PTEN*) ou ativação de oncogenes (*RAS*, *SRC*, *EGFR* ou *HER2*), pode ocorrer a transcrição de uma família de genes, relacionados geneticamente e funcionalmente, que incluem VEGFA (principal fator envolvido na iniciação da

neoangiogênese), VEGFB, VEGFC, VEGFD e o fator de crescimento placentário (PlGF). As funções biológicas do VEGF são mediadas pela sua ligação aos seus receptores tirosina-quinase: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. A neuropilina 1 (NRP1) é um co-receptor transmembrana, reforçando a atividade do VEGFR2. VEGFA₁₆₅ liga-se à neuropilina 1, influenciando a migração celular, a permeabilidade vascular e a arteriogênese. Outro ligante da neuropilina 1 é a semaforina 3A, que apresenta papel na regulação da maturação do vaso durante a angiogênese tumoral (LAMPROPOULOU e RUHRBERG 2014). A neuropilina 2 (NRP2) atua como co-receptor do VEGFR3. Os ligantes da neuropilina 2 são VEGFC e semaforina 3F, reforçando a linfangiogênese. Além disso, foi demonstrado que a neuropilina 2 pode reforçar a linfangiogênese através da ativação de integrina $\alpha 9\beta 1$ e FAK, independentemente do VEGFR3 (OU et al. 2015).

Cada subtipo de receptor recruta moléculas sinalizadoras diferentes (PlGF e VEGFB ligam-se ao VEGFR1, VEGFA liga-se ao VEGFR1, VEGFR2 e neuropilinas, VEGFC e VEGFD ligam-se ao VEGFR2 e VEGFR3), desencadeando sinais específicos na membrana plasmática.

VEGFR2 constitui o receptor predominante na sinalização pró-angiogênica. Após a ligação do VEGFA ao VEGFR2, a principal via ativada é a via PLC γ -PKC-MAPK, que irá aumentar a proliferação das células endoteliais. Além da proliferação, através da ativação de outras vias, este receptor regula a migração das células endoteliais (interação com integrinas), diferenciação e sobrevivência (PI3K-AKT), assim como dilatação e permeabilidade vasculares (óxido nítrico), resultando em última análise na formação de novos vasos (HOMSI e DAUD 2007; KERBEL 2008; SHIBUYA et al. 2011) (Figura 5).



Fonte: KERBEL (2008)

Figura 5 - Vias ativadas por fatores da família do VEGF. A principal via ativada pela interação do par VEGFA/VEGFR2 (principal interação observada durante as fases iniciais da neoangiogênese) é a via PLC γ -PKC-MAPK. Outras vias ativadas são PI3K-AKT e vias associadas com migração através da interação com integrinas.

Apesar do VEGFR2 ser o principal receptor para ativação das vias intracelulares, o VEGFA tem afinidade muito maior pelo VEGFR1, entretanto, a atividade tirosina-quinase do VEGFR1 é muito mais fraca do que a do VEGFR2 e a cascata de sinalização ativada por VEGFR1 não é completamente compreendida. Dessa maneira, acredita-se que este funcione como um regulador da angiogênese, agindo como um receptor-armadilha que se ligaria e reteria o VEGFA, de forma que uma menor expressão de VEGFR1 na membrana resultaria numa fração maior de VEGFA circulante com ligação mais frequente ao VEGFR2 e ativação das vias de

angiogênese, enquanto que, maior expressão do VEGFR1 levaria a uma redução do VEGF circulante disponível e menor ativação do VEGFR2 com conseqüente menor ativação das vias intracelulares responsáveis pela angiogênese. O VEGFR1 não é apenas um regulador negativo da angiogênese mediada por VEGFA, mas atua também como regulador positivo da angiogênese, com fraca intensidade, quando ativado pelos seus ligantes específicos PlGF e VEGFB (SHIBUYA et al. 2011; MARIEN et al. 2015). Foi observado, através de imuno-histoquímica, que VEGFR1 apresenta expressão em células endoteliais, monócitos, células hematopoiéticas, pericitos e células tumorais (MARIEN et al. 2015). AL-MAGHRABI et al. (2014) demonstraram que pacientes com câncer colorretal apresentam hiperexpressão de VEGFR1 quando analisado no tumor, entretanto não houve associação significativa da expressão desta proteína com a sobrevida.

O VEGFR3 é o receptor para VEGFC e VEGFD, e após a dimerização do receptor ocorre ativação das vias PKC e RAS, promovendo a linfangiogênese (KERBEL 2008; SHIBUYA et al. 2011). A expressão de VEGFR3 ocorre predominantemente no endotélio linfático, entretanto também ocorre na microvasculatura sanguínea, nos vasos em ramificação, sendo que, o bloqueio do VEGFR3 ocasiona redução da ramificação dos vasos, da densidade vascular, do brotamento de vaso sanguíneo e da proliferação endotelial (TAMMELA et al. 2008). Isso pode ser explicado pelo fato do VEGFR3 também ser expresso nas *tip cells* (GEUDENS e GERHARDT 2011). Além disso, em camundongos foi observado que o acréscimo de anticorpo anti-VEGFR3 ao anticorpo anti-VEGFR2 reforçou o efeito anti-angiogênico, podendo sugerir que tumores que apresentam hiperexpressão de

VEGFR3 nos vasos sanguíneos podem responder menos a tratamento isolado contra VEGFA, como bevacizumabe (TAMMELA et al. 2008).

Em 2010, SMITH et al. demonstraram, em diversos tipos de tumores sólidos, incluindo colorretal, a expressão de VEGFR2 e VEGFR3 no endotélio vascular e não nas células malignas. Em câncer colorretal, a intensidade de expressão tanto de VEGFR2 como VEGFR3 foi significativamente maior nos vasos do tecido tumoral do que no tecido normal adjacente. Em câncer colorretal, VEGFR2 foi expresso tanto em vasos sanguíneos quanto em vasos linfáticos tumorais, enquanto VEGFR3 foi encontrado predominantemente nos vasos linfáticos. Por outro lado, em câncer de mama, tanto VEGFR2 como VEGFR3 foram encontrados em níveis elevados nos vasos sanguíneos. Com resultados contraditórios em comparação aos mostrados acima, MARTINS et al. (2013) mostraram expressão de VEGFR2 e VEGFR3 nos tecidos tumorais, entretanto, não verificaram diferença significativa da intensidade de expressão destas proteínas no tecido tumoral em relação ao cólon normal adjacente (97% vs 93,7%, $p=0,06$ e 24% vs 24,5%, $p=0,90$, respectivamente). Nesse mesmo estudo, a expressão elevada de VEGFR3 esteve associada a pior sobrevida num subgrupo de pacientes com câncer primário do reto e estágio IV, enquanto a expressão de VEGFR2 não esteve associada à sobrevida.

O PIGF é uma glicoproteína dimérica que se liga ao VEGFR1. O PIGF é dispensável ao desenvolvimento vascular normal, mas tem relevância na angiogênese patológica e foi demonstrado que apresenta níveis elevados em diversos tumores, como gástrico, cólon, pulmão, mama, rim, fígado e cérebro, tendo influência no prognóstico destes tumores (FISCHER et al. 2008). Por outro lado, YAO et al. (2011), em modelos de linhagem celular tumoral, demonstraram que a eficácia do

anticorpo anti-PlGF ocorre apenas nas células tumorais com hiperexpressão de VEGFR1, provavelmente inibindo as vias MAPK e PI3K, acrescentado-se o fato de que não houve ação do anti-PlGF nas células endoteliais, não ocorrendo redução da angiogênese. Dessa forma, especula-se que expressão/atividade de VEGFR1 possa ser um potencial biomarcador para terapia anti-PlGF. WEI et al. (2005) demonstraram que PlGF foi expresso com maior frequência nas células tumorais do que nos tecidos normais, e que a expressão foi maior nos estádios mais avançados. Pacientes com níveis maiores de expressão de PlGF apresentaram pior sobrevida. SUNG et al. (2012), através de imuno-histoquímica, concluíram também que a expressão elevada de PlGF nas células tumorais está associada a estádios mais avançados (em nenhum paciente com EC I, em 11% nos com EC II, em 82% nos com EC III e em 100% nos com EC IV) e pior sobrevida em pacientes com câncer colorretal.

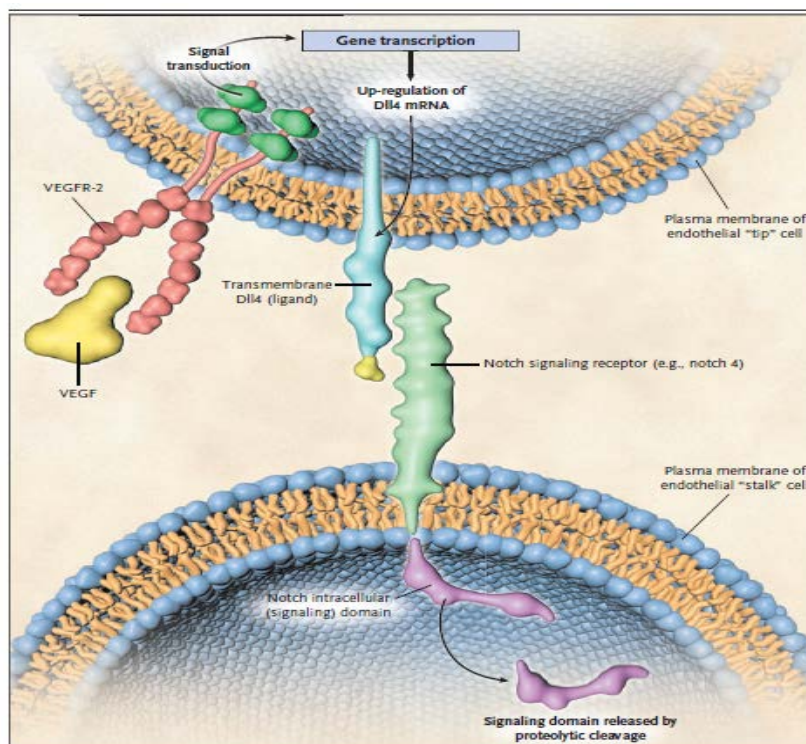
1.3.2 Via de sinalização NOTCH e WNT

O NOTCH é um receptor transmembrana que tem sido implicado na patogênese do câncer. A família NOTCH consiste de 4 receptores (chamados NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 e NOTCH4) e 5 ligantes (JAGGED 1 ou JAG1, JAG2, delta-like 1 ou DLL1, DLL3 e DLL4), que são proteínas transmembrana (RANGANATHAN et al. 2011).

NOTCH1, através da interação com seus ligantes e VEGFR2, determina o número de ramificações de novos vasos, sendo fundamental para a formação de vasos funcionantes. O NOTCH é importante para manter o equilíbrio da proliferação

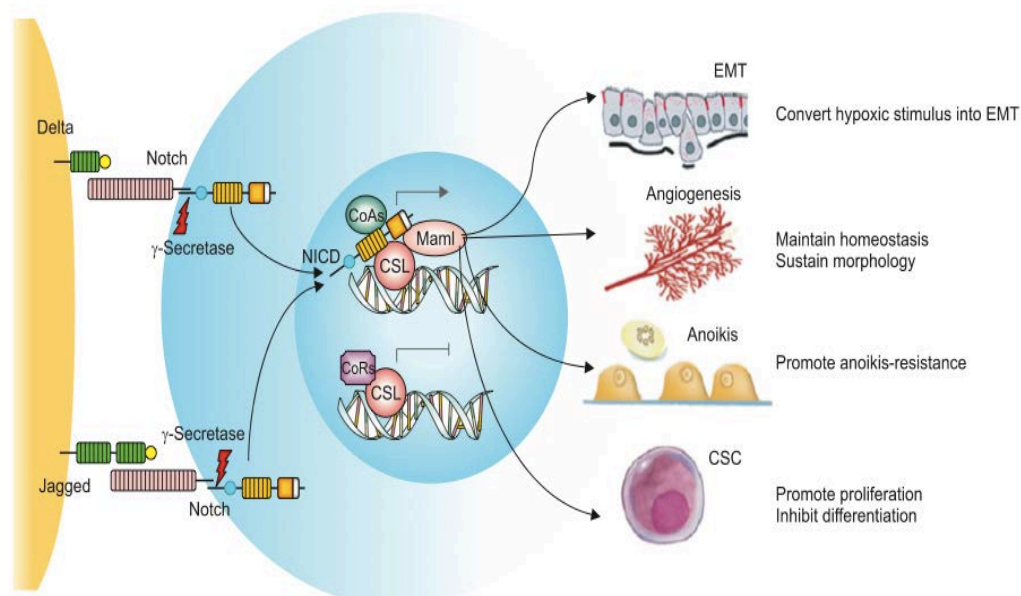
celular, diferenciação e apoptose, sendo que a perda desse equilíbrio pode resultar em iniciação, progressão e metástase do câncer colorretal (SUMAN et al. 2014).

Também foi demonstrado que a ligação do VEGFA ao VEGFR2 resulta em aumento da expressão do ligante transmembrana DLL4 na *tip cell*. Esse ligante interage com receptores NOTCH1 em células endoteliais adjacentes, geralmente responsáveis por uma nova ramificação, chamadas de *stalk cells*. Quando essa interação ocorre, o domínio intracelular do NOTCH1 é clivado de forma proteolítica por gama-secretases e ativa sinalizações intranucleares que irão culminar em menor produção e expressão de VEGFR2 (Figura 6a e 6b) e aumento da expressão de VEGFR1, assim essa via serve como uma retroalimentação negativa para ação do VEGFA (KERBEL 2008).



Fonte: KERBEL (2008).

Figura 6 - Interação entre VEGF, VEGFR2, DLL4 e NOTCH.

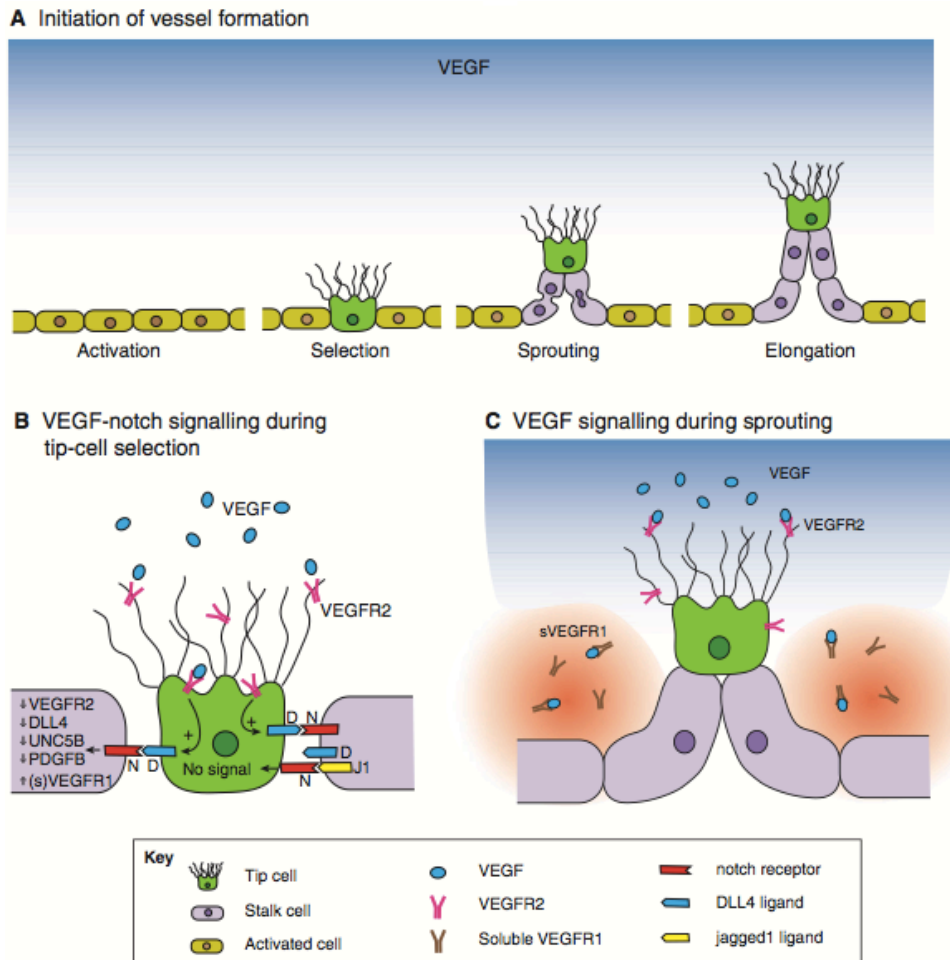


Fonte: ESKANDER e TEWARI (2014).

Figura 6a - Via de sinalização do NOTCH e seu papel na metástase. Os receptores de NOTCH são ativados pelos ligantes DLL e JAGGED de células adjacentes. Posteriormente, ocorre a clivagem proteolítica do domínio intracelular do NOTCH por γ secretases, translocando a proteína NICD para o núcleo, onde irá formar um complexo com a proteína CSL e coativadores causando a ativação transcricional de genes relacionados ao NOTCH. O resultado da via ativada pode promover transição epitélio-mesenquima, resistência das células tumorais a *anoikis*, manutenção da homeostasia e da morfologia na angiogênese, além de promover a proliferação e inibir a diferenciação das células-tronco

Dessa forma, ao reduzir a expressão de VEGFR2 e aumentar a de VEGFR1, deixando as células adjacentes menos responsivas a VEGF e mais sensíveis a outras moléculas, como PlGF, a sinalização através da interação entre NOTCH e DLL4 ou JAGGED1 (outro ligante do NOTCH, que é expresso na *stalk cell*), controla quais células irão migrar para formação de um novo vaso, tendo papel importante na seleção da *tip cell* e migração das *stalk cells*. Todo esse processo é dinâmico e constantemente reavaliado conforme as características das novas células vizinhas, uma vez que o próprio NOTCH regula o seu próprio inibidor, NRARP (*NOTCH-regulated ankyrin repeat protein*) (CARMELIET e JAIN 2011) (Figura 7).

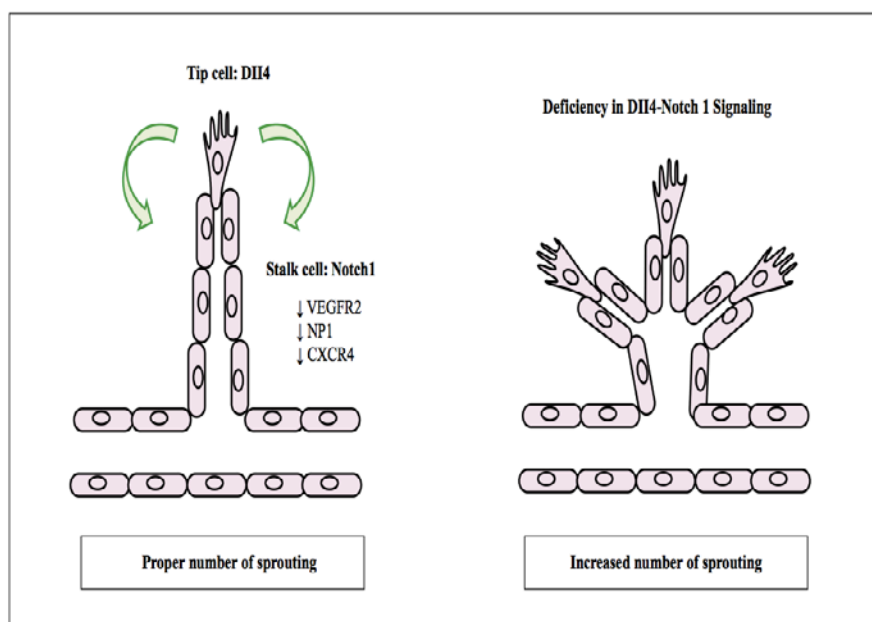
Ao contrário do que foi citado, BENEDITO et al. (2012) demonstraram que a expressão de DLL4 na *tip cell* da retina foi fracamente modulada pela via do VEGFR2. A inibição do NOTCH não teve impacto na expressão do VEGFR2 e induziu proliferação endotelial desregulada, mesmo na ausência de VEGFR2, o qual era considerado indispensável para o processo. Além disso, VEGFR3 foi fortemente modulado por NOTCH. Inibidores da atividade tirosina-quinase do VEGFR3 suprimiram a ramificação e proliferação das células endoteliais que tinham baixa atividade de NOTCH. Segundo os autores, esses resultados sugerem que VEGFR2 e VEGFR3 são regulados de forma diferente pelo NOTCH, e que a eficácia da inibição de cada um dos receptores ou dos ligantes dependeria do *status* da sinalização do NOTCH.



Fonte: GEUDENS e GERHARDT (2011).

Figura 7 - Papel da sinalização DLL4-NOTCH na escolha da *tip cell* e *stalk cells*. A presença de um gradiente de VEGF (em azul) ativa as células endoteliais (amarelas). Interação entre VEGF/VEGFR2/DLL4/NOTCH é responsável pela seleção de um número limitado de *tip cells* (verde), por bloquear a formação de *tip cell* nas células vizinhas. A *tip cell* é atraída pelo gradiente de VEGF e é seguida pelas *stalk cells*, causando uma ramificação para, posteriormente, formar um novo vaso.

Essa via é essencial na angiogênese fisiológica e desenvolvimento do embrião, uma vez que foi demonstrado que o nocaute de apenas 1 alelo DLL4 é letal para o embrião (haploinsuficiência). Na angiogênese tumoral, ao contrário do esperado, a inibição do DLL4 resultou em aumento da angiogênese, no entanto com vasos mal formados, uma vez que não há seleção adequada da *tip cell* e das *stalk cells* como citado acima, impedindo a circulação sanguínea, aumentando a hipóxia e reduzindo o tamanho tumoral (RIDGWAY et al. 2006) (Figura 8).



Fonte: SATO (2009)

Figura 8 - DLL4-NOTCH1 na angiogênese. DLL4 na *tip cell* ativa NOTCH1 na *stalk cell* e isso determina o número de ramificações de novos vasos por reduzir a ação de VEGFR2, neuropilina 1 e CXCR4. Quando a sinalização DLL4-NOTCH é deficiente, devido a não seleção de uma única *tip cell* e controle das *stalk cells* adjacentes, ocorre aumento do número de vasos mal formados, aumentando a hipóxia.

Especificamente no câncer colorretal, NOTCH interage com a via WNT que está associada com a carcinogênese de um grupo destes tumores. A proteína APC é um componente inibidor da via de sinalização WNT, que é crítica para a iniciação do câncer colorretal. A APC previne a migração de β -catenina, que é componente da via WNT, para o núcleo, onde ela atua como um regulador da transcrição, mantendo o estado de célula-tronco. A perda de APC é observada em > 80% dos casos de câncer colorretal, o que resulta em excesso de β -catenina livre, e assim em uma expansão sem controle da população de células-tronco e um aumento massivo no número e tamanho das criptas intestinais (ALBERTS et al. 2010a, b, c, d).

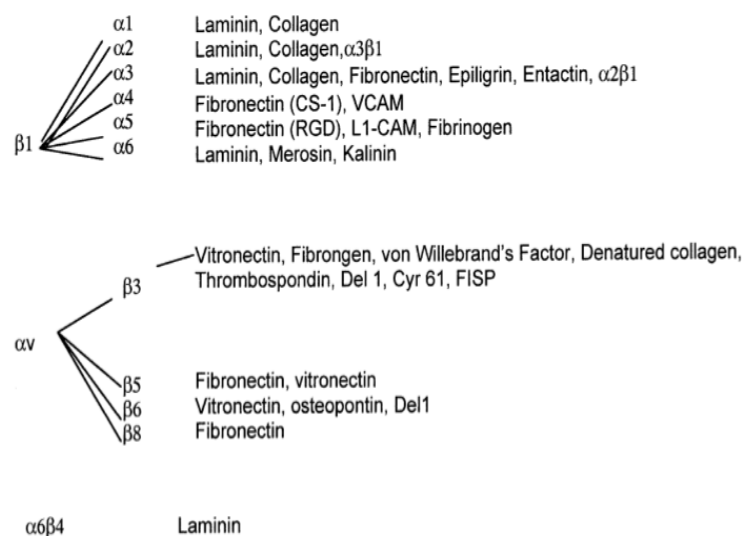
β -catenina ativa NOTCH em células de câncer colorretal através da regulação da expressão de JAGGED1 (RODILLA et al. 2009). Células endoteliais expressam ligantes da via WNT e seus receptores *frizzled* (FZD), que quando ativados, estimulam a proliferação celular endotelial (ativados por membros específicos da família WNT). Por sua vez, NOTCH ativa a via WNT, estimulando a proliferação das *stalk cells*. Essa é uma possível explicação do porque NOTCH, que geralmente inibe a proliferação desordenada, estimula a proliferação das *stalk cells* (CARMELIET e JAIN 2011).

JUBB et al. (2009) avaliaram a expressão de DLL4 em câncer colorretal e encontraram positividade na célula endotelial tumoral em 71% dos casos e ausência de expressão na célula endotelial da mucosa normal. CHU et al. (2010) encontraram expressão de NOTCH1 (considerando negativo: 0 e positivo: 1+, 2+ ou 3+) em 62% dos casos no tumor primário e expressão ausente na mucosa normal.

1.4 PAPEL DAS INTEGRINAS, E DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SUA SINALIZAÇÃO, NA ANGIOGÊNESE E COMO FATOR PROGNÓSTICO EM CÂNCER COLORRETAL

1.4.1 INTEGRINAS

As integrinas fazem parte das famílias das moléculas de adesão celular. Há muitas variedades de integrinas, sendo descritas pelo menos 24 na espécie humana. As integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas que se ligam ao citoesqueleto e podem mediar adesão celular, migração, proliferação e angiogênese (Figura 9).

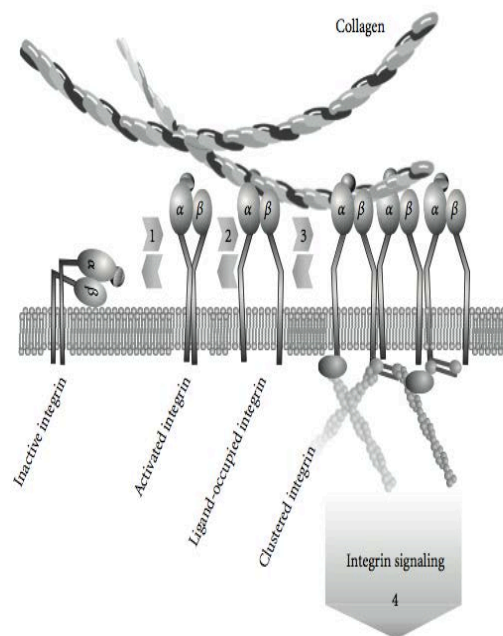


Fonte: HWANG e VARNER (2004).

Figura 9 - Integrinas envolvidas na angiogênese e seus ligantes mais comuns. Integrinas $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$, bem como $\alpha v\beta3$, $\alpha v\beta5$ e $\alpha v\beta8$ são expressas nas células endoteliais.

Uma molécula de integrina é composta de duas subunidades de glicoproteínas transmembrana associadas, denominadas α e β . As duas subunidades atravessam a membrana celular, com uma pequena cauda C-terminal intracelular e um grande domínio extracelular N-terminal. A porção extracelular liga-se diretamente a uma proteína extracelular, como a fibronectina ou a laminina. A cauda intracelular da integrina liga-se à talina, e essa, por sua vez, liga-se aos filamentos de actina. No seu estado inativo, a porção extracelular fica dobrada e, na porção intracelular, as subunidades α e β ficam em contato. Quando o domínio extracelular se desdobra, o contato das duas unidades é quebrado, tanto na porção extracelular como intracelular. Como resultado, o sítio de ligação da talina na cauda da cadeia β fica exposto e liga-se à talina e essa aos filamentos de actina, de forma que, quando um ligante da integrina (por exemplo: fibronectina, laminina, contra-receptores da superfamília das Igs - ICAM ou fibrinogênio) liga-se à sua porção externa, a célula reage ligando o seu citoesqueleto à molécula de integrina através da porção interna da molécula, isso é chamado ativação de fora para dentro. Uma ativação inversa, de dentro para fora, também pode ocorrer: moléculas reguladoras intracelulares, como fosfoinosítídeo PIP_2 , produzidas em resposta a sinais recebidos de fora da célula através de outros receptores da membrana como receptores tirosina-quinases, podem ativar a talina. A talina compete com a cadeia α de integrina pelo sítio de ligação na cauda da cadeia β , de modo que quando a talina liga-se a cadeia β , ela desfaz a ligação $\alpha\beta$ intracelular, separando as duas pernas da integrina na porção intracelular e, conseqüentemente, a porção externa sai da posição dobrada para a forma ativa estendida (ALBERTS et al. 2010a, b, c, d).

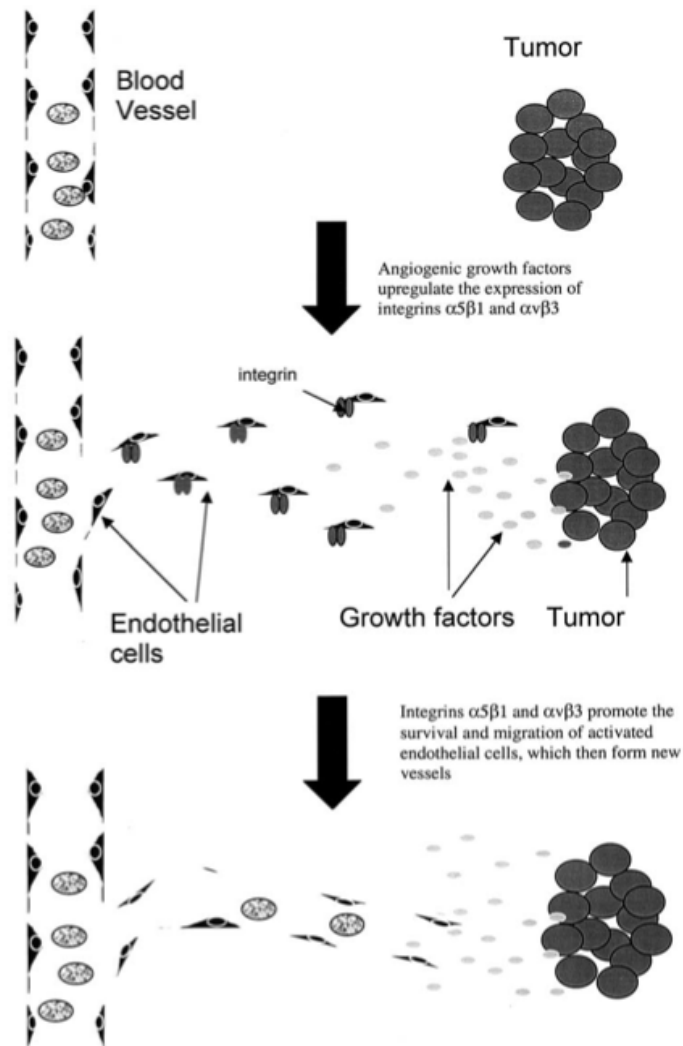
A interação entre essas vias de comunicação, com transmissão de sinal em ambas as direções, permite uma melhor interação entre a célula e o ambiente ao seu redor (XIONG et al. 2003). É sabido que as integrinas fazem mais do que somente ligação celular, elas também ativam vias de sinalização intracelular, por exemplo RAS-MAPK e FAK (*focal adhesion kinase*) permitindo influenciar o comportamento celular de acordo com a natureza da matriz circundante e o estado da ligação da célula com essa matriz (FU et al. 2012) (Figura 10).



Fonte: NILAND (2012).

Figura 10 - Estrutura, ativação e sinalização das integrinas. As integrinas são os principais receptores usados pelas células para ligarem-se à matriz extracelular. A ligação do ligante a molécula de integrina provoca uma mudança na sua conformação, deixando-a estendida, criando uma associação alostérica entre a ligação com a matriz extracelular e a ligação com o citoesqueleto no interior da célula permitindo que a integrina emita sinais nas duas direções.

A Figura 11 mostra como as integrinas auxiliam na neoangiogênese.



Fonte: HWANG e VARNER (2004)

Figura 11 - Influência das integrinas na neoangiogênese. Fatores pró-angiogênicos, produzidos pelo tumor, provocam um aumento da expressão de integrinas nas células endoteliais. As integrinas participam na formação de um novo vaso ao auxiliar, por exemplo, na regulação de metaloproteinases nos sítios de invasão, migração e invasão das células endoteliais ativadas pela matriz extracelular.

Após a ativação, devido à interação com seus respectivos ligantes, as integrinas podem regular atividades celulares por meio de interações cruzadas com

receptores de fatores de crescimento, incluindo receptores de VEGF, utilizando proteínas sinalizadoras comuns às duas vias (VLAHAKIS et al. 2005 e 2007).

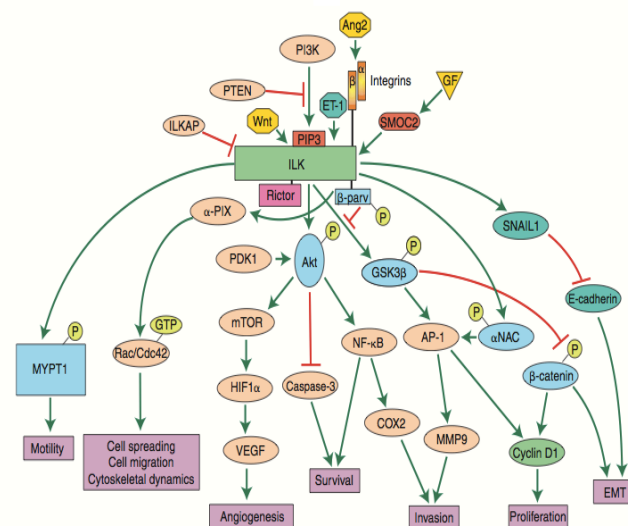
Nas células endoteliais, a ligação de integrina $\alpha_v\beta_3$ promove fosforilação e ativação do receptor 2 de VEGF (VEGFR2), como demonstrado por DE et al. (2005) em modelo experimental com camundongos. A ativação e fosforilação da integrina $\alpha_v\beta_3$ parece ser crucial para a fosforilação e ativação da tirosina-quinase do receptor de VEGFR2, e vice-versa, mecanismo esse que precisa da intermediação de SRC (MAHABELESWAR et al. 2006, 2007 e 2008). BYZOVA et al. (2000) em modelo experimental com cultura de células HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) mostrou que VEGFA ativa diretamente a integrina $\alpha_v\beta_3$ e aumenta a migração celular mediada pela mesma, além de ativar outras integrinas β_1 . Desta forma, este grupo mostrou que VEGF funciona como um indutor e ativador de integrinas.

ZHANG et al. (2008) demonstraram que, em camundongos depletados de integrina $\alpha_2\beta_1$, existe um aumento da expressão do receptor 1 de VEGF (VEGFR1) e que isto favorece a angiogênese em tumores gerados pela inoculação de células de melanoma da linhagem B16F10. Essa linhagem superexpressa PlGF, o ligante específico de VEGFR1. Já com a linhagem de carcinoma de pulmão de Lewis, que não expressa PlGF, só se observou aumento de angiogênese quando as células foram forçadas a expressar e secretar PlGF.

Quando interagem com seus ligantes as integrinas ativam as vias intracelulares ILK, FAK e PI3K, que também irão influenciar na angiogênese (NILAND e EBLE 2012).

1.4.2 ILK

A quinase acoplada a integrina (ILK, do inglês *integrin-linked kinase*) é uma proteína serina-treonina-quinase localizada nas adesões focais, que se associa aos domínios citoplasmáticos das subunidades beta1 e beta3 da integrina. ILK está envolvida com a transdução bidirecional de sinais, devido à ligação da integrina a moléculas da matriz extracelular. ILK é ativada por integrinas e mediadores solúveis e regulada por PI3K, sendo um componente central na ativação de vias celulares, principalmente ao regular a fosforilação de AKT e reduzir a expressão de E-caderina, por exemplo, o que, em última análise, irá modular o processo de motilidade, sobrevivência, invasão, proliferação celular e angiogênese. Na vasculatura normal, ILK tem papel agonista, sendo fundamental para manter a vasculatura íntegra (MCDONALD et al. 2008). (Figura 12).



Fonte: MCDONALD et al. (2008)

Figura 12 - Ativação e sinalização de ILK. ILK é um componente central de cascatas de sinalizações que controlam diversos processos que são cruciais tanto na homeostase do tecido normal, como para progressão do câncer. Ativação de ILK por integrinas ou mediadores solúveis resulta na ativação de vias que irão influenciar na motilidade, sobrevivência, transição epiderme-mesenquimal, invasão, proliferação e angiogênese. A atividade de ILK é antagonizada por ILKAP e PTEN.

BRAVOU et al. (2006) demonstraram a expressão de ILK em 98% dos tumores de pacientes com câncer colorretal (expressão em 98% dos casos do tumor primário e 100% das lesões metastáticas) e ausência de expressão no epitélio normal. Em modelos celulares e em camundongos com glioblastoma multiforme, EDWARDS et al. (2008) demonstraram que o tratamento com uma pequena molécula inibidora de ILK reduziu a expressão de VEGFA, retardou o crescimento tumoral e reduziu a angiogênese.

1.4.3 FAK

A quinase de adesão focal, FAK (do inglês *focal adhesion kinase*), é uma das principais proteínas tirosina-fosforiladas encontradas em locais onde há adesão focal. FAK participa da sinalização intracelular iniciada pelas integrinas. Nos locais de contato célula-matriz, quando as integrinas se agregam, a FAK é recrutada por proteínas de ancoramento intracelular como talina, a qual se liga a subunidade β da integrina, ou paxilina, a qual se liga a subunidade α da integrina. Após isso, as moléculas de FAK se transfosforilam criando um sítio de acoplamento para proteínas da família SRC de tirosina-quinases citoplasmáticas. Essas quinases fosforilam a FAK em tirosinas adicionais, criando sítios de encaixe para proteínas sinalizadoras intracelulares, e dessa forma ativando vias intracelulares (ZHAO e GUAN 2009). Fibroblastos deficientes de FAK formam muitas adesões focais, porém a migração celular é lenta, sugerindo que a FAK atue na dissociação das adesões focais, sendo isso necessário para a migração celular normal. Num estado patológico, com aumento dos níveis de FAK, como no câncer, as células se tornam mais móveis.

Dessa forma, FAK tem sido associada ao remodelamento da matriz extracelular, invasão e metástase (ALBERTS et al. 2010a, b, c, d).

Além da ativação via integrina, em células endoteliais, FAK também pode ser fosforilada por VEGFR2, ocasionando ativação de PI3K e dessa forma facilitando a migração da célula endotelial e a angiogênese. Inibidores de FAK têm sido desenvolvidos e mostrado ação antitumoral e na inibição da angiogênese em modelos animais (TAI et al. 2015).

WEINER et al. (1993) demonstraram que não houve detecção de FAK em tecidos normais do cólon, enquanto que no câncer localizado níveis elevados de mRNA (RNA mensageiro) de FAK foram detectados em 7 de 8 pacientes com tumor primário e 7 de 7 pacientes com metástase de câncer colorretal.

Por outro lado, THEOCHARIS et al. (2003) não encontraram associação da expressão de FAK com sobrevida em pacientes com doença localizada submetidos à cirurgia (FAK positivo foi considerado se > 5% de marcação, todos os casos foram considerados positivos em relação a mucosa normal, e hiperexpresso se >30% de marcação, encontrado em 40% dos casos). SUN et al. (2014), empregando um escore de 0 a 12 de imuno-histoquímica e utilizando a mediana como ponto de corte, demonstraram níveis de expressão maior na metástase do que no tumor primário, e nesse, maior do que na mucosa normal.

1.4.4 PI3K

Fosfoinosítídeo-3-quinase (PI3K) classe IA é um complexo enzimático composto por uma de três subunidades catalíticas (p110 α , p110 β e p110 δ) e uma subunidade regulatória (p85). PI3K é uma enzima ligada à membrana plasmática e à

cauda intracelular dos receptores de tirosina-quinases (RTKs). Após ser ativada por RTK ou por RAS, a PI3K catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol (presente na membrana celular) gerando fosfoinosítídeos (JEAN e KIGER 2014). A produção de PI-3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃) é a mais importante porque ela pode servir de sítio de ancoragem para proteínas de sinalização intracelular, como AKT. O PI(3,4,5)P₃ permanece na membrana celular até ser desfosforilado por fosfatases de fosfoinosítídeos específicas, como PTEN. A proteína AKT liga-se ao PI(3,4,5)P₃, produzido pela PI3K ativada, por meio de um domínio de interação específico, o PH (domínio de homologia com pleustrina), e é fosforilada pela proteína-quinase PDK1. Uma segunda fosforilação realizada pelo complexo 2 da mTOR deixa a AKT completamente ativada (DANIELSEN et al. 2015). Após ativada, AKT se dissocia da membrana plasmática e fosforila BAD, uma proteína presente no citoplasma que no estado não-fosforilado provoca a morte celular por apoptose, e que após fosforilada pela AKT torna-se inativada, promovendo inibição da apoptose e aumento da sobrevivência celular. A via PI3K-AKT ativa o complexo 1 da mTOR, que estimula a produção de ribossomos e a síntese proteica, promovendo o crescimento celular. A MAP-quinase, ERK, também pode ativar mTOR, assim as vias de sinalização da PI3K-AKT e RAS-MAPK convergem sobre o complexo 1 da mTOR na estimulação da proliferação celular (ALBERTS et al. 2010a, b, c, d).

PI3KCA codifica a subunidade catalítica p110 α e está mutado em 10 a 15% dos carcinomas colorretais, enquanto que mutações em *PTEN*, são encontradas em 2 a 10% dos pacientes com câncer colorretal, perda do número de cópias em 4 a 35%, e perda da expressão da proteína PTEN em 35 a 75%, todas resultando em crescimento celular descontrolado possivelmente por prolongar a sinalização através

de PI3K (DANIELSEN et al. 2015). Uma associação da via PI3K/AKT com angiogênese foi demonstrada por DELLINGER e BREKKEN (2011), visto que através do estímulo para proliferação e migração das células endoteliais linfáticas com VEGFA houve fosforilação de VEGFR2 e subsequente fosforilação de AKT via PI3K.

PHILLIPS et al. (1998) mostraram que a expressão da PI3K está aumentada em 86% dos casos de câncer colorretal quando comparado a mucosa intestinal normal.

Dois estudos mostraram que o aumento de sobrevida associado ao uso de aspirina em dose baixa após tratamento do câncer colorretal localizado foi restrito aos pacientes portadores de mutação em *PI3KCA*, sendo sugerido realização de estudo prospectivo com amostra maior para confirmação dos dados (LIAO et al. 2012 a; DOMINGO et al. 2013).

Utilizando imuno-histoquímica, RYCHAHOU et al. (2006) demonstraram que a subunidade p85 α de PI3K apresenta expressão forte no câncer colorretal nos estádios I a IV na maioria dos casos analisados, quando comparado a mucosa normal adjacente. A marcação foi principalmente nas glândulas do tecido tumoral, mas foi observado também marcação no citoplasma das células endoteliais e em células inflamatórias presentes no estroma, ao contrário do tecido normal, onde a marcação ficou praticamente limitada ao epitélio de superfície, com pouca expressão de p85 α nas células inflamatórias da lâmina própria. A expressão da subunidade p110 α de PI3K foi baixa, tanto no câncer como na mucosa normal adjacente.

Dando continuidade ao trabalho acima, JOHNSON et al. (2010), em 154 pacientes com câncer colorretal, demonstraram, através de imuno-histoquímica, que

a expressão de p85 α foi maior entre pacientes com estágio IV versus I a III, e a expressão de p85 α na mucosa normal adjacente à metástase foi maior do que na mucosa normal adjacente à doença localizada, podendo, em hipótese, possivelmente contribuir para o aumento e progressão da metástase. Não houve diferença da expressão de p85 α entre intestino direito (ceco, cólon ascendente, transverso) e esquerdo (cólon descendente, sigmóide e reto).

HUANG et al. (2014), numa meta-análise, confirmaram o efeito negativo do PI3K mutado no éxon 20 entre pacientes que receberam terapia anti-EGFR, enquanto mutação no éxon 9 não teve impacto em prever desfechos. LIAO et al. (2012b) concluíram que pacientes com câncer colorretal com mutação no gene PI3KCA no éxon 9 e 20 apresentam pior sobrevida, mas não houve associação quando a mutação foi no éxon 9 ou 20 de forma isolada.

ZHANG et al. (2012), verificaram através de imuno-histoquímica que a expressão de PI3K foi presente em 71,7%, pAKT em 65% e VEGF em 61,7% dos casos, entre 60 amostras de tumor de pacientes com câncer colorretal. Além disso, os níveis de expressão de PI3K e pAKT foram positivamente correlacionados com a expressão de VEGFA.

1.5 TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL COM ÊNFASE NA ANGIOGÊNESE

O tratamento do paciente com CCR metastático tem evoluído consideravelmente nos últimos anos. Na era pré-quimioterapia efetiva, a sobrevida global (SG) de pacientes com CCR metastático era de 6 meses. Com o advento e

exposição desses pacientes a fluoropirimidinas, oxaliplatina e irinotecano em combinação ou sequencial, além de agentes que atuam na angiogênese, como bevacizumabe, aflibercept ou regorafenibe, e agentes anti-EGFR, como panitumumabe e cetuximabe, a SG desses pacientes aumentou para uma mediana de 24 a 30 meses. A ressecção cirúrgica de metástases tem contribuído também para esse aumento de SG, sendo que cerca de 40-50% dos pacientes com metástases ressecadas encontram-se vivos em 5 anos (MEYERHARDT e MAYER 2005; TEMRAZ et al. 2014).

1.5.1 Principais drogas antiangiogênicas em câncer colorretal

Existem várias drogas com atividade antiangiogênicas que foram desenvolvidas para o tratamento do câncer colorretal metastático, incluindo anticorpos monoclonais anti-VEGF, anticorpos anti-VEGFR2 e inibidores de tirosina-quinases.

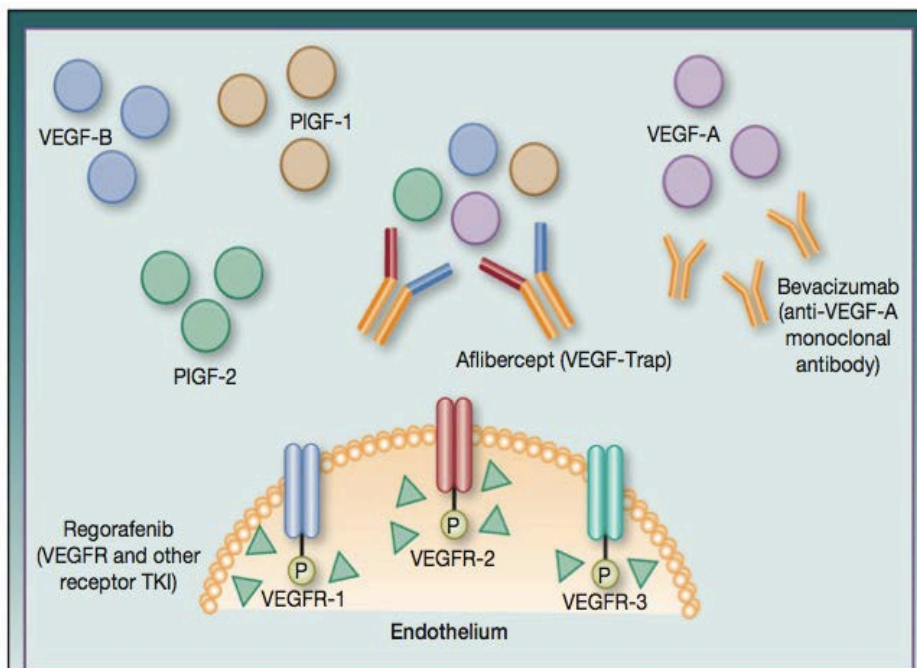
A Bevacizumabe

Em 1997 foi desenvolvido o bevacizumabe, primeiro anticorpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra o VEGF, criado pela união da região de ligação ao VEGF de um anticorpo murino com uma porção da cadeia pesada da imunoglobulina IgG1 humanizada (93% humano e 7% murino). Dessa forma, ele se liga e neutraliza o VEGF, reduzindo a concentração de VEGF circulante, contrabalançando o efeito pró-angiogênico do mesmo, reduzindo a ligação do mesmo ao VEGFR2 e reduzindo a ativação das vias intracelulares, citadas anteriormente,

que teriam efeito na promoção da angiogênese (REINACHER-SCHICK et al. 2008) (Figura 13).

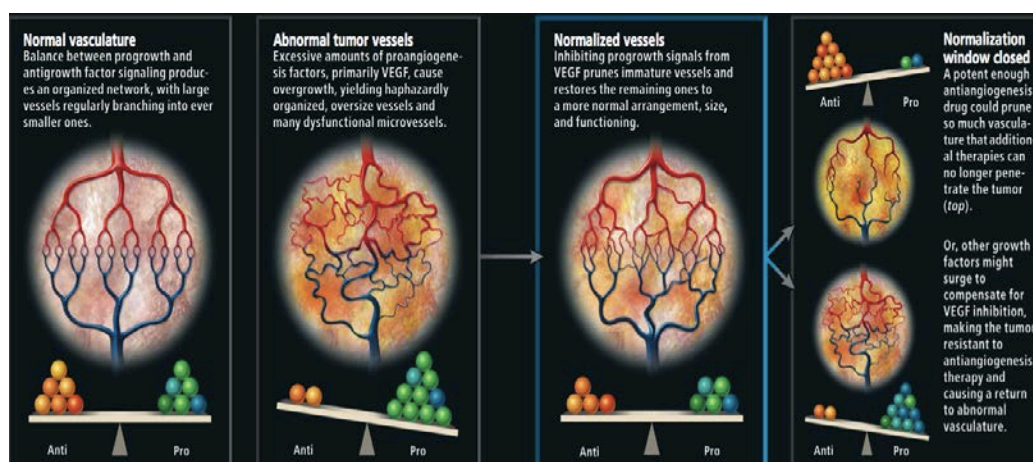
Entretanto, as respostas variáveis nos diferentes tipos de tumor e o fato de que os agentes anti-angiogênicos não trouxeram os benefícios que foram imaginados inicialmente, sugerem que o real mecanismo de ação do bevacizumabe, e dos agentes antiangiogênicos em geral, contra o câncer é complexo e ainda não é completamente entendido.

Além de controle ou redução tumoral por inibição do surgimento de novos vasos, redução dos vasos sanguíneos tumorais recém formados e efeito direto nas células tumorais (ELLIS 2006), propõe-se que as drogas antiangiogênicas normalizam a vasculatura tumoral, reduzindo o número de vasos malformados, tortuosos e com endotélio descontínuo, e, desta forma, a pressão intersticial intratumoral, aliviando a hipóxia e facilitando a passagem de outras drogas e de células imunes ao tecido tumoral, assim melhorando a ação do agente citotóxico administrado concomitantemente (JAIN 2013) (Figura 14).



Fonte: CIOMBOR et al. (2013).

Figura 13 - A figura mostra os alvos da ação do bevacizumabe (VEGFA), aflibercept (VEGFA, VEGFB e PIGF) e regorafenibe (tirosina-quinase do VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3).



Fonte: JAIN (2013).

Figura 14 - Mecanismo de ação antiangiogênica. Hipótese da normalização da vasculatura tumoral. Inicialmente o equilíbrio entre moléculas pró e anti-angiogênicas mantém a vasculatura organizada e eficiente. Posteriormente, com o aumento da produção de fatores pró-angiogênicos pelo tumor, ocorre um crescimento de vasos anormais. Ao instituir a terapia anti-angiogênica pode-se, ao reduzir a concentração de fatores pró-angiogênicos como VEGF, novamente equilibrar o equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos, deixando a vasculatura mais próxima do normal e assim melhorar a penetração de outras drogas no tumor. Por último, persistindo a ação da droga anti-angiogênica, pode haver redução da rede vascular a ponto de eliminar o tumor por falta de oxigênio e nutrientes, ou o tumor pode responder produzindo outros fatores pró-angiogênicos aumentando novamente a vasculatura anormal.

- **Uso de bevacizumabe em associação com quimioterapia no tratamento primeira linha do câncer colorretal metastático**

Um estudo randomizado, fase III, com 813 pacientes com doença metastática não tratados previamente, mostrou que a adição de bevacizumabe a um regime com irinotecano, fluorouracil e leucovorin (IFL) levou à melhora significativa nas taxas de resposta (44,8% x 34,8%, $p= 0,004$) e aumento da sobrevida mediana de 4,7 meses (20,3 x 15,6 meses, $p= 0,001$) (HURWITZ et al. 2004).

O estudo NO16966 por SALTZ et al. (2008), um estudo fase 3, randomizado, fatorial 2x2, comparando FOLFOX versus XELOX e a adição ou não de bevacizumabe aos esquemas citados, tinha como desfecho primário aumento de SLP. O estudo demonstrou aumento da SLP de 8,0 para 9,4m, $p<0,002$, porém não houve diferença em taxa de resposta, nem SG.

VAN CUTSEM et al. (2009), num estudo de acesso expandido (Estudo BEAT), mostraram que na prática o uso de bevacizumabe associado a FOLFOX, XELOX ou FOLFIRI esteve associado com uma SLP de 10,8 meses e SG de 22,7 meses, resultados semelhantes àqueles observados em ensaios clínicos randomizados. O estudo fase 4, ARIES (BENDELL et al. 2012), avaliou pacientes que receberam na prática clínica, FOLFOX com bevacizumabe ou FOLFIRI com bevacizumabe, mostrando desfechos similares.

O estudo BRiTE por KOZLOFF et al. (2009) foi um estudo prospectivo, observacional, para avaliar os desfechos na prática clínica, em 248 centros americanos, de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha associado com FOLFOX ou FOLFIRI na maioria dos casos. A SLP mediana para toda a população foi 9,9 meses, enquanto que a SG foi de 22,9 meses, resultados

semelhantes aos estudos clínicos randomizados. Os desfechos foram similares quando bevacizumabe foi associado ao FOLFOX ou ao FOLFIRI.

O estudo AVEX por CUNNINGHAM et al. (2013) randomizou pacientes acima de 70 anos para receber capecitabina e bevacizumabe versus capecitabina isolada. A terapia combinada apresentou maior SLP (9,1 meses versus 5,1 meses, HR 0,53, $p < 0,0001$), maior taxa de resposta (19,3% versus 10%, $p = 0,042$) e, numericamente, maior SG, porém sem significância estatística (20,7 meses versus 16,8 meses, HR 0,79, $p = 0,18$). O benefício apresentado veio às custas de maior toxicidade (\geq grau 3 em 59% para capecitabina e bevacizumabe versus 44,1% para capecitabina isolada).

LOUPAKIS et al. (2014) randomizaram pacientes para receber FOLFOXIRI e bevacizumabe versus FOLFIRI e bevacizumabe. O desfecho primário era SLP, sendo observado uma diferença de 12,1 meses versus 9,7 meses, respectivamente, HR 0,75, $p = 0,003$, a favor da combinação com FOLFOXIRI. A taxa de resposta também foi maior a favor do FOLFOXIRI e bevacizumabe (65% contra 53%, $p = 0,006$). A SG, apesar de numericamente maior para FOLFOXIRI e bevacizumabe, não atingiu significância estatística (31 meses versus 25,8 meses, HR 0,79, $p = 0,054$). A incidência de toxicidade grau 3 ou 4 (mucosite, neurotoxicidade, diarreia e neutropenia) foi maior no braço do FOLFOXIRI.

Assim, a adição de bevacizumabe parece aumentar a eficácia da quimioterapia, embora a magnitude do impacto observado não tenha sido sempre consistente nos estudos.

- **Bevacizumabe no tratamento de segunda linha do câncer colorretal**

O estudo E3200 por GIANTONIO et al. (2007) randomizou 829 pacientes candidatos a tratamento de segunda linha (tratados previamente com irinotecano e fluoropirimidina) entre FOLFOX4 com bevacizumabe, FOLFOX4 sem bevacizumabe ou bevacizumabe isolado (esse último braço foi fechado precocemente). O objetivo primário, aumento de sobrevida global, foi atingido, com uma SG mediana de 12,8 meses para a combinação versus 10,8 meses para FOLFOX isolado ($p=0,001$). Também foi observado aumento da SLP (7,3 meses versus 4,7 meses, $p<0,0001$) e da taxa da resposta (22,7% versus 8,6%, $p<0,0001$).

O estudo ML18147 por BENNOUNA et al. (2013) randomizou os pacientes, em segunda linha, para receber FOLFOX (se tratados com FOLFIRI em primeira linha) ou FOLFIRI (se tratados com FOLFOX em primeira linha) e manter ou não o bevacizumabe. Todos os pacientes haviam recebido bevacizumabe na primeira linha. O desfecho primário do estudo, aumento da SG a partir da randomização, foi alcançado com uma SG mediana de 11,2 meses versus 9,8 meses, HR 0,81, $p=0,006$, a favor da manutenção do bevacizumabe. Também houve aumento da SLP (5,7 meses versus 4,1 meses, HR 0,68, $p<0,0001$). A taxa de resposta foi baixa em ambos os braços (6% versus 4%, $p=NS$).

Uma comparação, não randomizada, entre quem recebeu ou não bevacizumabe após a primeira progressão de doença no estudo ARIES, mostrou SLP e SG favorável para aqueles que mantiveram bevacizumabe no tratamento após a progressão (GROTHERY et al. 2014). Uma subanálise do estudo observacional BRiTE (GROTHERY et al. 2008) também mostrou desfechos favoráveis para os

pacientes que mantiveram bevacizumabe na segunda linha após a progressão com esquema contendo o mesmo na primeira linha.

- **Comparação de bevacizumabe e terapia anti-EGFR**

O estudo CALGB/SWOG 80405, apresentado na ASCO 2014 (VENOOK et al. 2014), com desfecho primário de SG, mostrou que pacientes KRAS selvagem (N=1140) tratados em primeira linha com quimioterapia (73% FOLFOX e 27% FOLFIRI) com bevacizumabe versus a mesma combinação em associação com cetuximabe apresentam sobrevida global semelhantes (29 meses no braço bevacizumabe versus 29.9 meses no braço cetuximabe, $p=0,34$). Também não houve diferença na SLP (10,8 meses versus 10,4 meses respectivamente, $p=0,55$). Não houve diferença tampouco quando a associação de cada anticorpo foi feita com cada um dos esquemas quimioterápicos. Dados desse estudo com análise ampliada do RAS (KRAS éxon 2, 3 e 4 e NRAS éxon 2, 3 e 4) foram apresentados na ESMO 2014 (LENZ et al. 2014). A SG (31,2 meses para bevacizumabe versus 32 meses para cetuximabe) e a SLP continuaram sem diferença estatisticamente significativa, porém foi observada maior taxa de resposta no braço com cetuximabe (53,6% para bevacizumabe versus 68,6% para cetuximabe, $p<0,01$).

O estudo FIRE-3 por HEINEMANN et al. (2014) avaliou 592 pacientes com KRAS selvagem no éxon 2 que receberam FOLFIRI em primeira linha em combinação com bevacizumabe ou cetuximabe. Não houve diferença em taxa de resposta, desfecho primário do estudo, nem em SLP (10,3 meses no braço bevacizumabe versus 10,0 meses para cetuximabe, HR 1.06, $p=0,55$) entre os dois braços, entretanto houve prolongamento da SG (25 meses versus 28,7 meses a favor

da combinação com cetuximabe, HR 0,77, $p=0,01$). Resultados de uma revisão radiológica independente, com análise ampliada do *RAS* para *KRAS* e *NRAS* éxon 2, 3 e 4 foram apresentados na ESMO 2014 (STINTZING et al. 2014). Houve uma maior taxa de resposta (56,1% versus 72%, $p=0,003$) e maior SG (25 meses versus 31 meses, HR 0,69, $p=0,005$), ambos a favor da combinação com cetuximabe. Nessa mesma avaliação radiológica independente, mesmo os pacientes com *KRAS* selvagem apenas no éxon 2 tiveram maior taxa de resposta com cetuximabe (55,6% versus 66,5%, $p=0,01$).

- **Comparação entre bevacizumabe e outras terapias antiangiogênicas**

O estudo fase 3 HORIZON III (SCHMOLL et al. 2012) avaliou bevacizumabe com FOLFOX versus a combinação de cediranibe (um inibidor de tirosina-quinase contra VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 e alguma atividade contra PDGF e c-KIT) com FOLFOX. Apesar dos dois braços apresentarem taxa de resposta, SLP e SG numericamente semelhantes, não foi atingido o critério de não-inferioridade para SLP do braço com cediranibe em relação ao bevacizumabe.

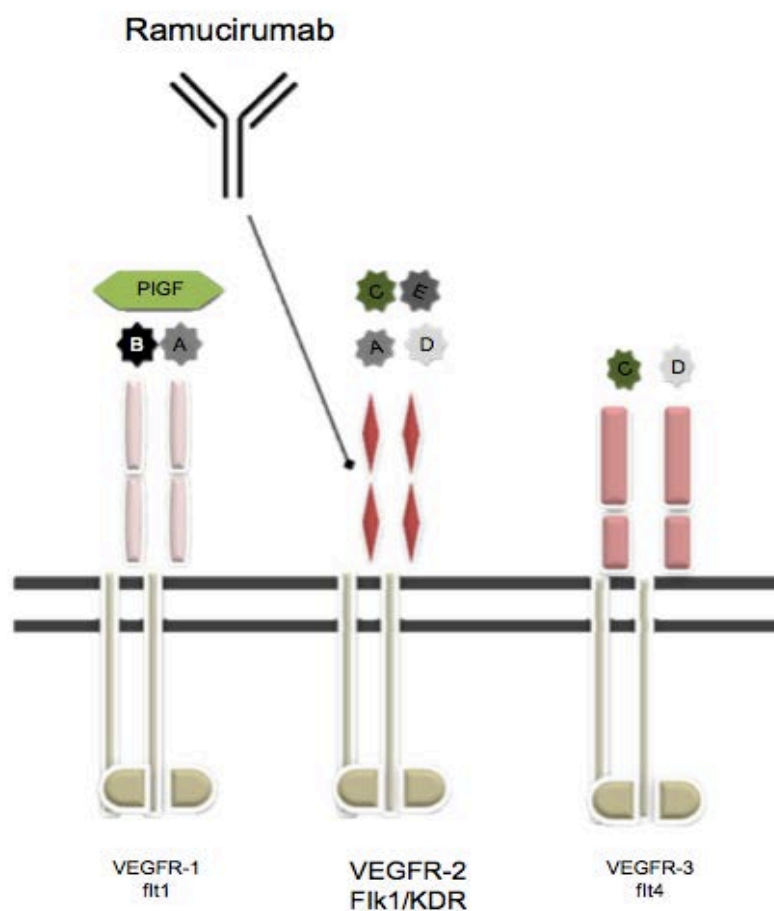
B Aflibercept

O aflibercept consiste da fusão do domínio 2 da cadeia de imunoglobulina do VEGFR1 com o domínio 3 da imunoglobulina do VEGFR2 através da porção Fc da cadeia pesada de imunoglobulina IgG1 humana. O mesmo funciona simulando um receptor circulante, servindo de armadilha para o ligante. Por ter na sua estrutura os domínios tanto de VEGFR1, como de VEGFR2, o mesmo tem a capacidade de inibir VEGFA, VEGFB e PlGF (CIOMBOR et al. 2013) (Figura 13).

O estudo fase 3 VELOUR (VAN CUTSEM et al. 2012) randomizou 1226 pacientes, tratados previamente em primeira linha com esquema contendo oxaliplatina (30% dos pacientes receberam também bevacizumabe em primeira linha), para receber em segunda linha FOLFIRI com aflibercept ou FOLFIRI com placebo. A SG, o desfecho primário do estudo, foi maior para o braço com aflibercept (13,5 meses versus 12,06 meses, HR 0,81, $p=0,003$). Também houve melhora na SLP (6,9 meses versus 4,67 meses, HR 0,75, $p<0,0001$) e taxa de resposta (19,8% versus 11,1%, $p=0,0001$). Uma análise de subgrupo planejada previamente, com os 30% de pacientes que haviam feito uso prévio de bevacizumabe, mostrou SG de 12,5 meses versus 11,7 meses (HR 0,86, IC95% 0,67 - 1,10) com e sem aflibercept, respectivamente. No subgrupo sem uso prévio de bevacizumabe houve aumento da SG de 12,4 meses para 13,9 meses (HR 0,78, IC95% 0,69 - 0,92). Os autores concluíram que o benefício com aflibercept ocorreu tanto naqueles que foram expostos previamente ao bevacizumabe, quanto nos que não foram (sem heterogeneidade no subgrupo, $p=0,56$ para interação) (TABERNERO et al. 2014), apesar da diferença em SG mediana ser de 0,8 meses e o intervalo de confiança cruzar a unidade no braço que recebeu aflibercept.

C Ramucirumabe

É um anticorpo monoclonal humano anti-VEGFR2 (Figura 15).



Fonte: APRILE et al. (2014).

Figura 15 - Anticorpo ramucirumabe contra o domínio externo do VEGFR2.

O estudo fase 3 RAISE (TABERNERO et al. 2015) randomizou 1072 pacientes que haviam progredido após primeira linha com FOLFOX e bevacizumabe para receber FOLFIRI com ramucirumabe ou FOLFIRI mais placebo. Houve ganho de SG com ramucirumabe, desfecho primário do estudo (13,3 meses versus 11,7 meses, HR 0,84, $p=0,02$), e de SLP (5,7 meses versus 4,5 meses, HR 0,79, $p=0,0005$), porém sem ganho em taxa de resposta (13,4% versus 12,5%, $p=0,63$).

D Regorafenibe

O regorafenibe é um inibidor de múltiplas tirosina-quinases que inibe a atividade de tirosina-quinase de VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, TIE2, PDGFR β , KIT, RET e BRAF resultando em efeitos anti-angiogênicos e anti-proliferativos no tumor (REY et al. 2015) (Figura 13).

GROTHEY et al. (2013), no estudo fase 3 randomizado CORRECT, randomizaram 760 pacientes que já haviam recebido previamente todas as drogas comprovadamente ativas e disponíveis para o tratamento de câncer colorretal metastático (100% dos pacientes receberam bevacizumabe previamente) para receber regorafenibe ou placebo. O objetivo primário, aumento de SG, foi alcançado (6,4 meses versus 5,0 meses, HR 0,77, $p=0,005$, a favor do regorafenibe). A SLP mediana foi de 1,9 meses para regorafenibe versus 1,7 meses para placebo (HR 0,49, $p<0,0001$). A taxa de resposta foi baixa, 1% com regorafenibe e 0,4% com placebo, entretanto, a taxa de controle de doença (resposta mais doença estável por 6 ou mais semanas desde a randomização) foi maior com o uso do regorafenibe (41% versus 14,9%, $p<0,000001$).

E Cediranibe

É um inibidor de tirosina-quinase específico contra VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 (FERRAROTTO e HOFF 2013).

Cediranibe ou placebo associado a FOLFOX/CAPOX, em primeira linha de tratamento, foi avaliado num estudo fase 3, randomizado e duplo cego, HORIZON II (HOFF et al. 2012). Os pacientes que receberam cediranibe apresentaram um modesto aumento de SLP (8,6 meses versus 8,3 meses, HR 0,84, $p=0,01$), porém sem

ganho em SG (19,7 meses versus 18,9 meses, HR 0,94, p=0,57), nem taxa de resposta.

F Sunitinibe

É um inibidor de sítio de tirosina-quinase, incluindo VEGFR1, VGFR2, VGFR3 e PDGFR (FERRAROTTO e HOFF 2013).

Um estudo randomizado fase 3, de tratamento de câncer colorretal metastático em primeira linha, comparando FOLFIRI associado ao sunitinibe ou a placebo (CARRATO et al. 2013) não mostrou melhores resultados e foi fechado precocemente pelo excesso de toxicidade atribuído ao acréscimo do sunitinibe.

Com base nos estudos citados anteriormente, em 2004 o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou, para o tratamento do câncer colorretal, a primeira terapia como modalidade antiangiogênica, o bevacizumabe, seguido da aprovação em 2012 do aflibercept e regorafenibe. No Brasil, temos a aprovação pela ANVISA, do bevacizumabe.

O bevacizumabe é, ainda, a terapia anti-angiogênica mais empregada em combinação à quimioterapia no tratamento do câncer colorretal metastático.

Apesar de dispormos hoje de múltiplas drogas, já incorporadas à prática clínica, com atividade antiangiogênica, para nenhuma delas existe biomarcadores solidamente associados à taxa de resposta ou sobrevida.

1.6 ANÁLISE DE MARCADORES ENVOLVIDOS COM ANGIOGÊNESE COMO PROGNÓSTICOS OU PREDITORES DE EFICÁCIA DA TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA COM BEVACIZUMABE

A identificação de marcadores para terapia-alvo em câncer é necessária, uma vez que, em geral, apenas um subgrupo de pacientes irá se beneficiar do tratamento, de forma que considerando toda a população tratada, o benefício global do tratamento se dilui e expõe desnecessariamente uma grande parcela da população tratada à toxicidade. Considerando o custo dos medicamentos, encontrar um marcador capaz de predizer quem irá responder ao tratamento é uma necessidade não só clínica, mas econômica também. Contudo, até o momento, nenhum marcador preditivo de desfechos com bevacizumabe foi validado para uso na prática clínica (LAMBRECHTS et al. 2013).

1.6.1 Marcadores clínicos

Vários marcadores clínicos têm sido pesquisados. Resultados de uma meta-análise mostraram que, em pacientes com câncer colorretal que são tratados com bevacizumabe, o desenvolvimento de hipertensão está associado com maior taxa de resposta, SLP e SG (CAI et al. 2013).

Em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia e bevacizumabe, BOISEN et al. (2013) evidenciaram que o benefício do acréscimo do bevacizumabe à quimioterapia foi restrito aos pacientes com tumores primários no sigmóide e reto, quando comparado a tumores do ceco ao cólon descendente. No

braço da quimioterapia sem bevacizumabe não houve associação entre o sítio primário e o desfecho de eficácia.

1.6.2 Marcadores biológicos

A procura de um biomarcador para bevacizumabe ou demais agentes que atuam na angiogênese é um desafio, porque a angiogênese é um processo altamente complexo e adaptativo. Apesar do VEGFA ser o principal fator envolvido e o mais constante, diversos outros fatores também influenciam o processo, como PIGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoietinas (ANG), entre outros. Além disso, fatores que promovem a degradação proteolítica da matriz ou induzem a maturação da vasculatura, como PDGF, efrina e NOTCH também influenciam o processo, mostrando que a atividade do bevacizumabe pode ser compensada por diversos sinais angiogênicos alternativos.

Diferenças anatômicas, funcionais e moleculares na vasculatura tumoral entre os diversos tumores e entre os diferentes estágios (localizado versus metastático) de um mesmo tipo de tumor aumentam a complexidade na procura de um biomarcador de eficácia ao bevacizumabe. Por conta dessas dificuldades, especula-se que um único biomarcador não seja suficiente para predizer de forma confiável os desfechos do tratamento com bevacizumabe e ser reproduzido entre os diversos tumores (LAMBRECHTS et al. 2013). Por exemplo, no estudo ABIGAIL (um estudo fase II randomizado comparando bevacizumabe + carboplatina e gencitabina versus bevacizumabe + carboplatina e paclitaxel, em pacientes com câncer de pulmão avançado não escamoso), níveis baixos de VEGFA pré-início do tratamento foi associado a maior SLP e SG. Nível sérico de fator de crescimento de fibroblasto,

VEGFR1, VEGFR2 e PlGF, além de análise em tecido tumoral de VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, neuropilina e CD31 não foram associados a TR, SLP ou SG (MOK et al. 2014).

À procura de um fator preditivo em pacientes tratados com bevacizumabe em câncer colorretal, citam-se alguns estudos com marcadores que também foram utilizados no nosso estudo, como, o estudo fase III MAX (que testou a combinação de capecitabina, bevacizumabe e mitomicina), onde amostras tumorais dos pacientes foram utilizadas para avaliar a expressão de VEGFR1 através de imunohistoquímica. Não houve associação entre a expressão de VEGFR1 e sobrevida livre de progressão, entretanto baixa expressão de VEGFR1 esteve associada com maior SG ($p=0,001$) (WEICKHARDT et al. 2011). Presume-se, portanto, que o bevacizumabe mimetize o efeito do VEGFR1, porque VEGFA tem alta afinidade por VEGFR1, porém esse apresenta fraco potencial para ativação de vias intracelulares. Dessa forma, pacientes com baixa expressão de VEGFR1 teriam maior probabilidade de se beneficiar do uso do bevacizumabe, uma vez que o VEGFA produzido não estaria sendo sequestrado pelo VEGFR1 localmente, e, conseqüentemente, haveria uma concentração maior de VEGFA circulante, fazendo mais sentido o papel da inibição pelo bevacizumabe.

YILDIZ et al. (2010), avaliando a expressão de VEGFR3 por imunohistoquímica em bloco de parafina de espécimes tumorais (positivo em 20% dos casos) de pacientes com câncer colorretal metastático tratados com bevacizumabe e quimioterapia, não encontraram impacto nos desfechos de eficácia associados com a expressão desta proteína.

Em relação a via do PI3K como possível biomarcador de resposta ao bevacizumabe, foi realizada uma análise retrospectiva de 42 pacientes com câncer colorretal metastático que receberam bevacizumabe, sendo 31% em primeira linha e 69% em segunda linha de tratamento. A expressão da subunidade p110 α de PI3K não esteve associado com taxa de resposta, SLP nem SG. Baixa expressão de PTEN foi associado à taxa de resposta ao tratamento (SCLAFANI et al. 2014).

Além dos estudos com as proteínas citadas acima, entre outros possíveis biomarcadores avaliados no tecido tumoral por imuno-histoquímica pode-se citar o VEGFA. Como o bevacizumabe liga-se diretamente ao VEGFA, uma correlação entre níveis de VEGFA expresso pelo tumor e resposta ao bevacizumabe é a primeira hipótese a ser feita (MARIEN et al. 2015). Contudo, à despeito desse racional lógico, JUBB et al. (2006), avaliando expressão de VEGFA em células tumorais, não conseguiram distinguir pacientes que se beneficiam ou não do bevacizumabe. POHL et al. (2011) não encontraram correlação entre a taxa de resposta e expressão de VEGF no tumor, entretanto pacientes com resposta parcial aos 6 meses tiveram maior expressão de VEGF do que aqueles com doença estável aos 6 meses. Por outro lado, BRUHN et al. (2014) demonstraram que pacientes tratados com bevacizumabe e com baixa expressão de VEGFA no tumor apresentaram maior taxa de resposta e maior SLP. Também foi observado que a expressão de PDGFR-BB esteve associada a maior resposta em pacientes com câncer de mama submetidos à quimioterapia e bevacizumabe neoadjuvantes, e maior densidade de microvasos imaturos com maior TR em câncer de pulmão (LAMBRECHTS et al. 2013).

Ainda em relação aos possíveis biomarcadores biológicos de eficácia, GOEDE et al. (2010), através de imuno-histoquímica e RT-PCR quantitativo,

demonstraram que pacientes com câncer colorretal apresentaram expressão de angiopoietina 2 no estroma tumoral, mas não nas células tumorais. Além disso, os pacientes com tumores metastáticos tratados com quimioterapia e bevacizumabe (estudo com braço único) e com níveis baixos de angiopoietina 2 (ANG2) pré-tratamento, apresentaram maior TR, SLP e SG. Os autores discutem que ANG2 tem sido descrita como oponente da normalização da vasculatura, dessa forma, na presença de níveis altos de ANG2, o bevacizumabe seria menos eficaz na normalização os vasos tumorais para maior eficácia da quimioterapia. Nesse mesmo estudo, análises dos níveis de VEGFA no sangue e densidade de microvasos não foram associados a TRO, SLP, nem SG. RONZONI et al. (2010) evidenciaram que pacientes com níveis baixos de células endoteliais circulantes (CEC) avaliadas por citometria de fluxo, pré-tratamento com quimioterapia associada ao bevacizumabe, apresentaram maior TR e SLP. Não houve diferença nos desfechos em relação ao nível de células endoteliais progenitoras (CEP). Dois estudos em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia associada a bevacizumabe utilizaram CellSearch para identificar as CEC. SIMKENS et al. (2010) não evidenciaram diferença na SLP, nem SG em relação ao número de CEC, enquanto MATSUSAKA et al. (2011) observaram maior SLP e SG em pacientes com baixos níveis de CEC. Apesar das diferenças técnicas entre os estudos e diferentes pontos de corte, o número de CECs continua como um promissor biomarcador de eficácia em pacientes com câncer colorretal metastático tratado com terapia anti-angiogênica (MANZONI et al. 2015).

KOPETZ et al. (2010), num estudo fase II com 43 pacientes tratados com FOLFIRI e bevacizumabe, pesquisaram no sangue 37 fatores angiogênicos antes do

início do tratamento e no momento da progressão de doença. Nível baixo de interleucina 8 (IL8) pré-tratamento esteve associado a maior SLP. No momento da progressão foi detectado aumento do nível sérico do fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), do fator de crescimento de hepatócito (HGF), e do fator 1 derivado do estroma (SDF1), enquanto o VEGFR2 solúvel teve seus níveis reduzidos no momento da progressão. Seguindo o mesmo raciocínio, no intuito de observar como os fatores envolvidos com a angiogênese se comportam após o início do bevacizumabe para tentar compreender melhor os possíveis mecanismos de sensibilidade e resistência ao tratamento em pacientes com câncer colorretal, foi observado que após o início do bevacizumabe houve aumento do nível sérico de VEGFA (WILLETT et al. 2009), PIGF (WILLETT et al. 2009; LOUPAKIS et al. 2011; LIEU et al. 2013) e VEGFD (LIEU et al. 2013).

A isoforma curta do VEGF (VEGF¹²¹) não foi associada a SLP ou SG em pacientes portadores de câncer colorretal e câncer renal tratados com bevacizumabe, contudo esteve relacionada a maior SLP e SG em pacientes com câncer de mama, maior SG em pacientes com câncer de pâncreas e gástrico, além de uma tendência a maior SLP em pacientes com câncer de pulmão (LAMBRECHTS et al. 2013).

Em relação aos marcadores genéticos, recentemente foram avaliados os polimorfismos de nucleotídeo único (158 *SNPs*) em genes da via de VEGF (14 genes) no estudo randomizado AViTA (gemcitabina e erlotinibe com ou sem bevacizumabe) em pacientes com câncer de pâncreas. Um *SNP* em VEGFR1 esteve associado a expressão de VEGFR1 e a maiores SLP e SG no braço tratado com bevacizumabe, mas não no braço que recebeu placebo (LAMBRECHTS et al. 2012). Também foi observada associação de VEGFR1 rs9582036 com maior TR em câncer

colorretal, VEGFR2 +889G/A alelo G com maior TR em câncer colorretal, IL8 - 251T/A portadores TT com maior TR em câncer colorretal e câncer de ovário e CXCR1 +860G/C com maior TR em câncer colorretal, CXCR2 +785C/T alelo C com maior TR em câncer colorretal (LAMBRECHTS et al. 2013).

LOUPAKIS et al. (2013) realizaram uma validação prospectiva de *SNPs* candidatos a biomarcadores da via VEGF/VEGFR (VEGFA, VEGFR2 e incluindo o *SNP* em VEGFR1 citado no estudo AViTA acima) em pacientes com câncer colorretal metastático tratados em primeira linha com FOLFIRI e bevacizumabe e não conseguiram validar os possíveis candidatos a biomarcador de eficácia ao bevacizumabe previamente identificados em estudos retrospectivos.

Além da avaliação de marcadores no tecido tumoral, biomarcadores circulantes no sangue e avaliação da densidade de microvasos no tecido tumoral, outras modalidades têm sido adotadas no intuito de descobrir um biomarcador, como técnicas de imagem não invasivas que demonstram a microcirculação, como ressonância magnética dinâmica com contraste (HIRASHIMA et al. 2012), além de tomografia com emissão de pósitron que consegue detectar redução da angiogênese e expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$, por exemplo (RYLOVA et al. 2014; WITHOFS et al. 2015).

LAMBRECHTS et al. (2013) revisaram os marcadores mais promissores em relação ao bevacizumabe, por terem mostrado valor preditivo em estudos controlados com placebo com número significativo de pacientes ou por algum achado ser consistente entre os estudos. Seguem os resultados nas tabelas abaixo.

Quadro 1 - Fatores angiogênicos circulantes como biomarcadores preditivos de eficácia do bevacizumabe em câncer colorretal.

Proteína	Câncer	Referência	Estudo	N	Fase	Detalhes do estudo	Correlação com desfecho
VEGFA	Colorretal	GOEDE et al. 2010	-	34	-	Bevacizumabe + FOLFIRI/XELIRI ou FOLFOX/XELOX	Não (TR, SLP, SG)
	Colorretal, pulmão e rim	HEGDE et al. 2013	-	1816	> 1 estudo fase 3		Não (TR, SLP, SG)
Isoformas curtas de VEGFA	Colorretal	JAYSON et al. 2011	AVF 2107g	398	III	IFL ± bevacizumabe	Não (SLP, SG)
sVEGFR1	Reto	DUDA e JAIN 2010	-	32	I/II	Braço único com bevacizumabe + quimioterapia neoadjuvante	Sim (resposta ao tratamento)
IL-8	Colorretal	KOPETZ et al. 2010	-	43	II	FOLFIRI + bevacizumabe	Sim (SLP)
ANG2	Colorretal	GOEDE et al. 2010	-	34	-	FOLFIRI/XELIRI + bevacizumabe ou FOLFOX/XELOX + bevacizumabe	Sim (TR, SLP e SG)
IL-8: interleucina 8; ANG2: angiopoietina 2.							

Fonte: Adaptado de LAMBRECHTS et al. (2013).

Quadro 2 - Fatores angiogênicos circulantes com mudança na expressão durante o tratamento com bevacizumabe em câncer colorretal.

Proteína	Câncer	Referência	Estudo	N	Fase	Detalhes do estudo	Mudança durante o tratamento com bevacizumabe
VEGFA	Colorretal	WILLETT et al. 2009	NCI 5642	32	II	Bevacizumabe + 5FU	Aumento em diferentes momentos após iniciar o tratamento com bevacizumabe
PIGF	Colorretal	KOPETZ et al. 2010	-	43	II	FOLFIRI + bevacizumabe	Aumento progressivo até progressão da doença
		LOUPAKIS et al 2011	-	25	II	FOLFOXIRI + bevacizumabe	Aumento durante tratamento com bevacizumabe
		WILLETT et al. 2009	NCI 5642	32	II	Bevacizumabe + 5FU	Aumento durante tratamento com bevacizumabe
VEGFC	Colorretal	LIEU et al. 2013		42	II	FOLFIRI + bevacizumabe	Aumento durante tratamento com bevacizumabe e na progressão
VEGFD	Colorretal	LIEU et al. 2013	-	42	II	FOLFIRI + bevacizumabe	Aumento na progressão
bFGF	Colorretal	KOPETZ et al. 2010	-	43	II	FOLFIRI + bevacizumabe	Aumento próximo ao momento da progressão e na progressão
PDGF-BB	Colorretal	KOPETZ et al. 2010	-	43	II	FOLFIRI + bevacizumabe	Aumento próximo ao momento da progressão e na progressão
SDF1	Colorretal	KOPETZ et al. 2010	-	43	II	FOLFIRI + bevacizumabe	Aumento no momento da progressão
bFGF: fator de crescimento de fibroblasto básico; PDGF-BB: fator de crescimento derivado da plaqueta BB; SDF1: fator 1 derivado de células estromais.							

Fonte: Adaptado de LAMBRECHTS et al. (2013).

Quadro 3 - Biomarcadores *in situ* no tumor ou no estroma preditivos da eficácia ao tratamento com bevacizumabe.

Marcador	Câncer	Referência	Estudo	N	Fase	Detalhes do estudo	Método	Correlação com desfecho
VEGFR1	Colorretal	FOERNZLER et al. 2010	NO16966	247	III	XELOX/FOLFOX ± bevacizumabe	IHQ no tumor	Não (SLP, SG)
		WEICKHARDT et al. 2011	AGITG MAX	268	III	Capecitabina ou Capecitabina + bevacizumabe ou capecitabina + bevacizumabe + mitomicina	IHQ no tumor	Não (SLP), Sim (SG): baixa expressão de VEGFR1 aumentou benefício do bevacizumabe
NRP1	Colorretal	FOERNZLER et al. 2010	NO16966	247	III	XELOX/FOLFOX ± bevacizumabe	IHQ no tumor	Baixa NRP1 aumenta o benefício do bevacizumabe
NRP1: neuropilina 1								

Fonte: Adaptado de LAMBRECHTS et al. (2013).

Quadro 4 - Marcadores genéticos como biomarcadores preditivos de eficácia ao tratamento com bevacizumabe.

Gene	Câncer	Referência	Estudo	N	Fase	Detalhes do estudo	Variante genética	Correlação com desfecho clínico
VEGFA	Colorretal	LOUPAKIS et al. 2011	-	218 (111 com bevacizumabe)	-	FOLFIRI ± bevacizumabe	-2578A/C (rs699947), -460C/T (rs833061), -634G/C (rs2010963), -936C/T (rs3025039)	-460C com maior SLP e SG em pacientes tratados com bevacizumabe
		HANSEN et al. 2012	Nordic ACT	218	III	FOLFIRI/XELIRI ± bevacizumabe ou FOLFOX/XELOX ± bevacizumabe	Cinco SNPs (sem especificação)	Não (TR)
		KOUTRAS et al. 2012	-	209	III	FOLFIRI/XELIRI + bevacizumabe	-634G/C (rs2010936), +936C/T (rs3025039), -1154G/A (rs1570360), -2578A/C (rs699947)	Não SLP; -2578A e -1154A com maior SG
		GERGER et al. 2011	-	119	-	FOLFOX/XELOX + bevacizumabe	-634G/C (rs2010936), +936C/T (rs3025039), -1154G/A (rs1570360), -460C/T (rs833061), -2578A/C (rs699947)	Não (TR, SLP, SG)
	Diversos, incluindo colorretal	LAMBRECHTS et al. 2011	NO16966, AVAiL, AViTA, AVOREN, AVADO	1348 (669 com bevacizumabe)	-	Tratamentos variados	158 SNPs na via VEGF	Alelo rs699946-A se correlaciona com maior SLP nos pacientes tratados com bevacizumabe
VEGFR1	Colorretal	HANSEN et al. 2012	Nordic ACT	218	III	FOLFIRI/XELIRI ± bevacizumabe ou FOLFOX/XELOX ± bevacizumabe	rs9582036	Alelo rs9582036 aumenta a TR ao bevacizumabe
VEGFR2	Colorretal	GERGER et al. 2011	-	119	-	FOLFOX/XELOX + bevacizumabe	+889G/A	Alelo G correlacionado com maior TR
	Diversos, incluindo colorretal	LAMBRECHTS et al. 2011	NO16966, AVAiL, AViTA, AVOREN, AVADO	1348 (669 com bevacizumabe)	-	Tratamentos variados	158 SNPs na via VEGF	Alelo rs11133360-T com maior SLP nos pacientes com bevacizumabe
IL8	Colorretal	LO GIUDICE et al. 2010	-	35	-	Quimioterapia + bevacizumabe	-251T/A	Variável TT associada a maior TR
CXCR2	Colorretal	GERGER et al. 2011	-	119	-	FOLFOX/XELOX + bevacizumabe	+785C/T	Alelo C com maior TR
CXCR2: receptor de quimocinas; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único								

Fonte: Adaptado de LAMBRECHTS et al. (2013).

Apesar desses resultados, muitos desses marcadores tiveram resultados negativos, no mesmo ou em outro tipo de tumor, ou quando utilizado outro método de avaliação.

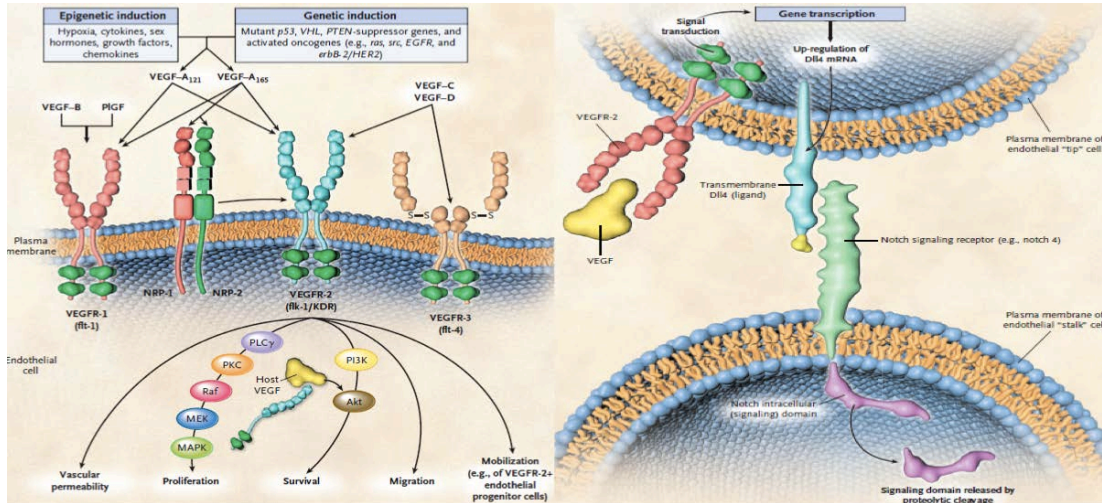
Até o momento nenhum biomarcador preditor de desfecho com terapia antiangiogênica foi validado em estudo prospectivo, portanto não devendo ser utilizados na prática clínica diária. Contudo, é de fundamental importância persistir na busca destes biomarcadores, no intuito de aumentar o benefício dessas drogas e possibilitar que elas sejam oferecidas aos pacientes que de fato irão se beneficiar e não expor os pacientes que não tem probabilidade de se beneficiar a efeitos colaterais indesejáveis, além de reduzir custos.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Atualmente, como citado acima, sabe-se que o tratamento quimioterápico não irá beneficiar todos os pacientes, sendo de suma importância encontrar biomarcadores capazes de predizer melhor taxa de resposta, sobrevida livre de progressão (SLP) e principalmente SG.

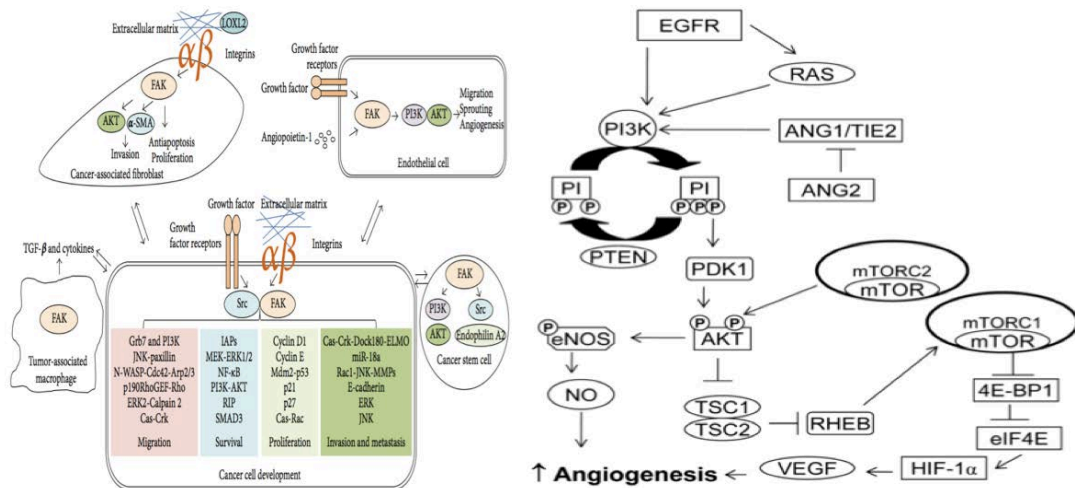
Após a revisão do racional teórico, podemos perceber que, até o momento, não há nenhum biomarcador definitivo preditor de desfecho com terapia antiangiogênica. No intuito de acrescentar informação nessa linha, tentamos avaliar se existe associação entre o benefício do tratamento sistêmico com bevacizumabe de pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal metastático e a expressão de proteínas que estão associadas com angiogênese. Para tal fim, escolhemos VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4 e NOTCH1, integrinas (integrina $\alpha_2\beta_1$ e integrina $\alpha_v\beta_3$) e proteínas associadas com sinalização através destas últimas (ILK, FAK e PI3K) por estarem envolvidas diretamente ou em parte com regulação da angiogênese, como mostram as Figuras 16, 17 e 18.

A identificação de um biomarcador reprodutível e de fácil avaliação permitiria reduzir a exposição, a um tratamento potencialmente tóxico, de indivíduos onde a terapia antiangiogênica não seria eficaz.



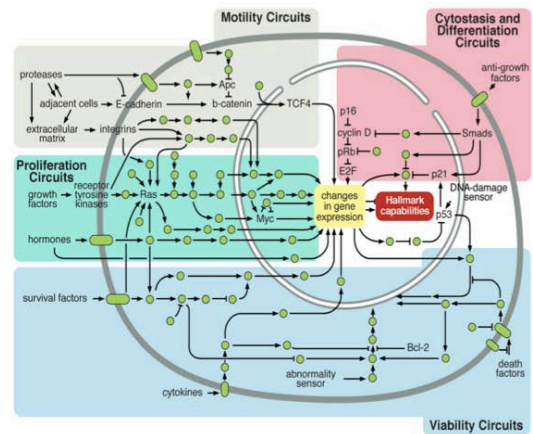
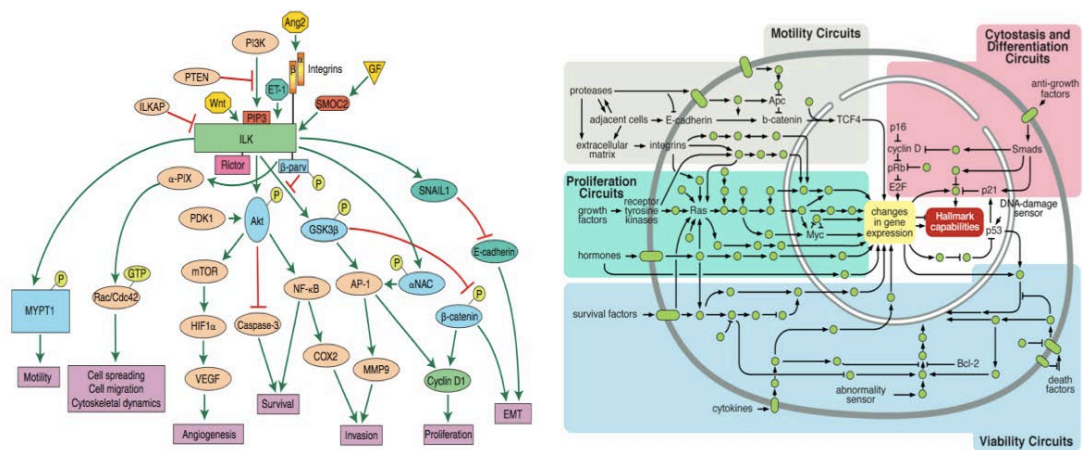
Fonte: Adaptado de KERBEL (2008).

Figura16 - Regulação da angiogênese por VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4, NOTCH e PI3K.



Fonte: Adaptado de KARAR e MAITY (2011) e TAI et al. (2015).

Figura 17 - Regulação da angiogênese por VEGFR2, integrinas, FAK e PI3K.



Fonte: Adaptado de MCDONALD et al. (2008) e HANAHAN e WEINBERG (2011).

Figura18 - Regulação da angiogênese por integrinas, ILK e PI3K.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a expressão de proteínas associadas com controle de angiogêneses (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4 e NOTCH1) e de integrinas (integrina $\alpha_2\beta_1$ e integrina $\alpha_v\beta_3$) e de proteínas associadas com sinalização através destas (ILK, FAK e PI3K) com taxa de resposta ao tratamento, a sobrevida livre de progressão e sobrevida global em pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal metastático tratados com bevacizumabe.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Avaliar as características clínicas e patológicas e a associação destas com a taxa de resposta, SLP e SG.
- 2 Testar a associação da expressão de VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4, NOTCH1, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, FAK e PI3K com as características clínicas e patológicas.
- 3 Avaliar a associação dos marcadores citados acima entre si.
- 4 Averiguar a associação da mutação do gene *KRAS* com características clínicas e patológicas, taxa de resposta, SLP e SG e com a expressão de VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4, NOTCH1, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, FAK e PI3K.

- 5 Avaliar, numa coorte de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha de tratamento, as características clínicas e patológicas, e a expressão de VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PlGF, DLL4, NOTCH1, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, FAK e PI3K, correlacionando-as com taxa de resposta, SLP e SG.
- 6 Comparar a expressão de VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PlGF, DLL4, NOTCH1, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, FAK e PI3K entre material anátomo-patológico do tumor primário e da metástase.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo de coorte, retrospectivo, uni-institucional.

4.2 CASUÍSTICA

4.2.1 Seleção dos Pacientes

- **Critérios para seleção**

Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma colorretal (CID10 C18 e C20) metastático que tenham recebido bevacizumabe como parte do tratamento sistêmico entre 2006 e 2009.

- **Critérios de inclusão**

Pacientes que receberam ≥ 2 ciclos de bevacizumabe associado à quimioterapia com esquema FOLFOX, FOLFIRI ou demais esquemas contendo 5FU infusional.

- **Critérios de exclusão**

Pacientes que receberam apenas 1 ciclo de bevacizumabe;

Combinação com outros esquemas de quimioterapia diferente de FOLFOX, FOLFIRI ou ausência 5FU infusional;

Ausência de material anátomo-patológico disponível nos arquivos;

Realização de tratamento em outra instituição diferente do A. C. Camargo Cancer Center;

Ausência de dados suficientes no prontuário médico.

4.2.2 Grupos de pacientes

A GRUPO CASOS

Foi realizado levantamento de pacientes que iniciaram bevacizumabe (que tenham recebido ≥ 2 ciclos) associado à quimioterapia para o tratamento de adenocarcinoma colorretal metastático (CID10 C18 e C20), entre maio/2006 e novembro/2009 a partir do banco de dados da Central de Quimioterapia do Departamento de Oncologia Clínica do A.C Camargo Cancer Center. Foram identificados neste levantamento 151 pacientes.

B GRUPO CONTROLE

Foi realizado levantamento retrospectivo de pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal metastático (CID C18 e C20) e que receberam quimioterapia sistêmica baseada em fluoropirimidina infusional associada a irinotecano ou à oxaliplatina, no período entre 2002 e 2004 (período onde esses esquemas começaram a ser utilizados com frequência na instituição, porém quando o bevacizumabe ainda não era disponível) a partir do banco de dados da Central de Quimioterapia do Departamento de Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer

Center. Foram encontrados 150 pacientes. Após seleção, foram identificados 30 pacientes com as características desejadas para o estudo (pacientes com câncer colorretal metastático que foram tratados com FOLFOX ou FOLFIRI, sem uso de bevacizumabe). Os casos que foram tratados com irinotecano ou oxaliplatina, mas com os esquemas IFL ou FLOX foram excluídos.

C GRUPO DE VALIDAÇÃO

Foram selecionados 50 pacientes, com as mesmas características do grupo de casos, que receberam quimioterapia associado ao bevacizumabe entre janeiro/2007 a outubro/2012 para tentar validar os resultados encontrados na população inicial.

4.3 RASTREAMENTO E SEPARAÇÃO DE LÂMINAS E BLOCOS

4.3.1 Grupo Casos

Foram separados blocos de parafina e lâminas correspondentes ao tumor primário e metástase quando disponíveis. Quando o material de apenas um sítio foi disponível, então esse foi o material selecionado para a análise.

Dentre os 151 pacientes, havia material patológico disponível de 117 pacientes. Onze pacientes foram excluídos por qualidade inadequada do material patológico arquivado, resultando em 106 potenciais pacientes para análise definitiva. Destes, 01 não dispunha de dados clínicos nos prontuários do hospital, 2 receberam bevacizumabe associado a IROX e 1 recebeu bevacizumabe associado a raltitrexate, e foram excluídos, restando 102 pacientes. Sendo que desses, 39 pacientes

apresentavam material patológico disponível apenas da metástase, enquanto 63 dispunham de material do tumor primário. Dentre os 63 com material de tumor primário, 14 também dispunham de um segundo material anátomo-patológico da metástase.

Nove pacientes receberam bevacizumabe associado à quimioterapia após cirurgia com ressecção completa de toda doença macroscópica e foram excluídos para análise da taxa de resposta.

4.3.2 Grupo Controle

Foram separados blocos de parafina e lâminas correspondentes ao tumor primário e metástase quando disponíveis. Quando o material de apenas um sítio foi disponível, então esse foi o material separado. Entre 30 pacientes selecionados pelos critérios clínicos, apenas 11 pacientes apresentaram bloco de parafina disponível (Figura 19). Devido o número pequeno da amostra, o que dificultaria ou inviabilizaria a realização de testes de associação e análises confiáveis de sobrevida, foi decidido por não se realizar avaliação clínica e patológica no grupo controle e excluí-lo do presente estudo.

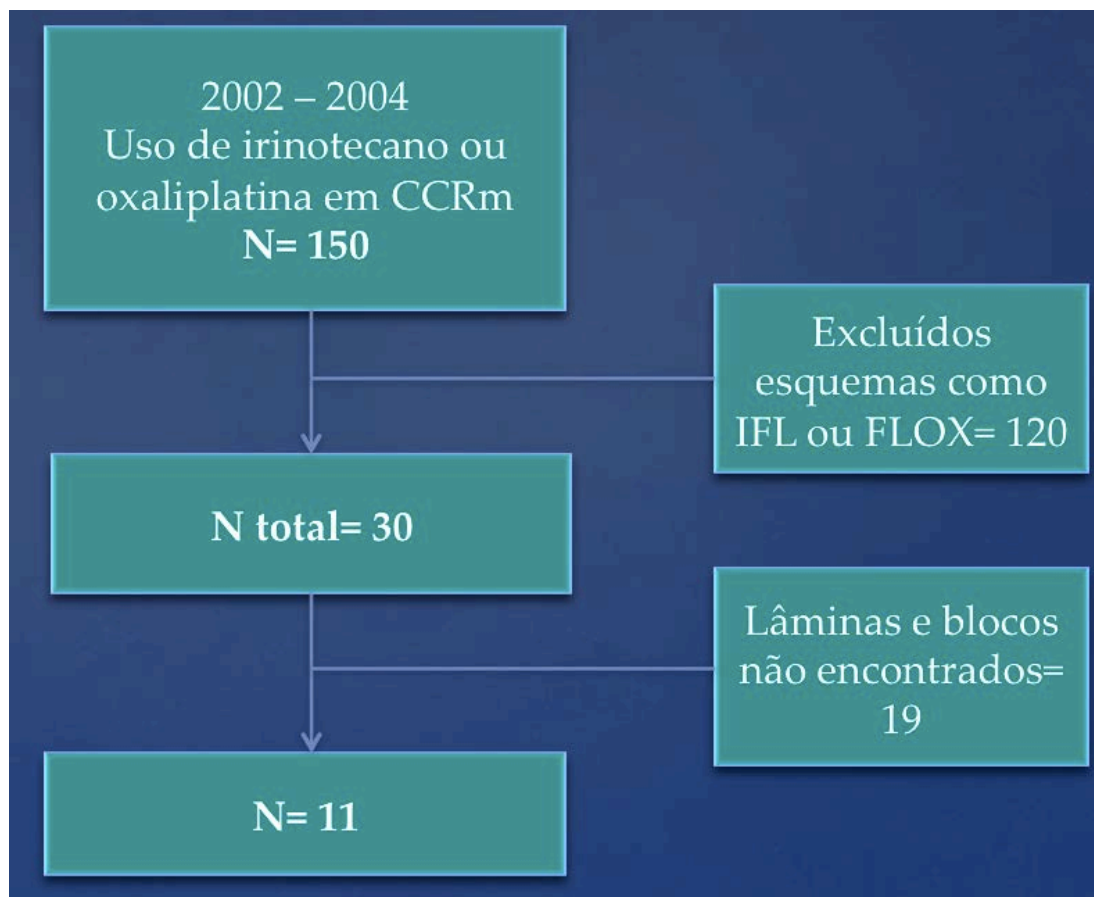


Figura 19 - Fluxograma com a seleção dos pacientes no grupo controle. Pacientes metastáticos que receberam FOLFOX, FOLFIRI ou quimioterapia com 5FU infusional (exceto se contra-indicação ao 5FU), mas não bevacizumabe e com material anátomo-patológico disponível para análise (N=11).

4.3.3 Grupo de Validação

Foram separados blocos de parafina e lâminas correspondentes ao tumor primário e metástase quando disponíveis. Quando o material de apenas um sítio foi disponível, então esse foi o material separado. Dentre os 50 pacientes selecionados, em 8 casos não havia dados no prontuário, em 4 não havia tumor viável no material anátomo-patológico arquivado, em 2 casos o material anátomo-patológico não estava disponível, em 3 casos os pacientes receberam tratamento clínico no A.C. Camargo Cancer Center, mas o seguimento clínico foi realizado em outro serviço, e em 2

casos os pacientes receberam apenas 1 ciclo de quimioterapia e foram excluídos. Assim, restaram 31 pacientes com informações completas. Sendo que desses, 5 pacientes apresentavam material patológico disponível apenas da metástase e 26 do tumor primário. Entre esses 26 com material de tumor primário, 7 também dispunham de um segundo material anátomo-patológico de metástase.

4.4 CONSTRUÇÃO DOS TISSUE MICROARRAYS (TMAs)

Os blocos correspondentes aos tumores dos casos selecionados para este estudo foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica. Novos cortes histológicos foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE). Através de microscopia óptica, áreas representativas do tumor foram identificadas e marcadas. Procedeu-se então à marcação do bloco de parafina (bloco doador) na área escolhida, com caneta permanente.

Utilizando o *tissue microarrayer* (Beecher Instrument, Silver Spring, MD, USA) foram extraídos cilindros de 1,0 mm das áreas marcadas, e os mesmos foram transferidos para novos blocos de parafina (bloco receptor).

Existe uma ordem nessa execução, feita de maneira sistemática, orientada através de uma tabela de Excel, que foi utilizada para determinar a posição e identificação exata dos casos no TMA.

Cada caso é representado duas vezes, e o resultado final demonstra uma espécie de imagem em espelho do outro. Cada bloco de TMA foi cortado em micrótomo rotativo a uma espessura de 5,0 micrômetros e os cortes foram transferidos para lâminas silanizadas (StarFrost Knittel Glass, Braunschweig,

Germany). Para melhor assegurar a adesão do corte, esta técnica empregou-se uma fita adesiva que melhora a aderência do corte histológico à lâmina de vidro, reduzindo o risco de descolamento na mesma durante o banho-maria. Para a retirada desta fita é necessário o emprego de luz UV (luz essa fornecida pelo próprio fabricante da lâmina). Para melhor acondicionar as lâminas cortadas a partir do TMA, é feito um banho de parafina com a finalidade de proteger os cortes para posterior realização das reações de imuno-histoquímica (Figura 20a e 20b).

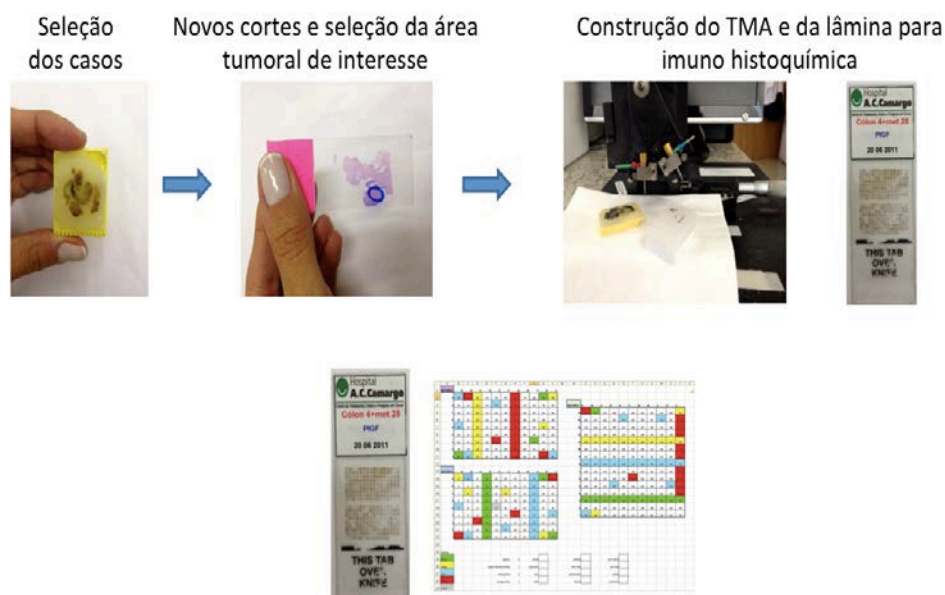


Figura 20a - Processo da escolha do material anátomo-patológico até a montagem do TMA.



Figura 20b - Exemplo de lâmina de TMA.

4.5 PROTOCOLO DE REAÇÕES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas pela técnica Suely Nonogaki, que seguiu um protocolo padrão citado abaixo.

Desparafinização dos cortes de 3,0 μm de espessura, do material incluído em parafina, e deixadas por 24 horas em estufa a 60°C.

Banhos sequenciais com:

Xilol a 60°C por 20 minutos;

Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;

Etanol 100% 30 segundos;

Etanol 85% 30 segundos;

Etanol 70% 30 segundos.

As lâminas foram então lavadas em água corrente e destilada.

A solução tampão citrato 10 mM pH=6,0 ou 9,0 (a depender do anticorpo) foi fervida em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina®) destampada. As lâminas foram mergulhadas na solução em ebulição. A panela foi lacrada com a válvula seletora de pressão no número 2. Após a pressurização total foram

aguardados 3 minutos e a válvula seletora de pressão foi girada para liberação de vapor. Então a panela fechada foi deixada sob água corrente até a despressurização total. A panela foi destampada e as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e, posteriormente, com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - *phosphate buffered saline*) 10 mM pH=7,4 por 5 minutos.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em títulos previamente estabelecidos, conforme quadro abaixo (Quadro 5), em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA – *bovine serum albumin*) 1% (Sigma, cat# A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 30 min. a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Posteriormente foram incubadas por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Leica cat # RE7260-k, Reino Unido) e novamente lavadas com tampão PBS com 3 trocas de 3 min. cada.

Incubação com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C foi realizada. As lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

As lâminas foram incubadas em solução substrato: 100 mg de 3, 3' – diaminobenzidina-tetrahydrocloro (DAB) (Sigma, cat# D-5637, EUA); 1,0 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1,0 mL de H₂O₂ 6%; 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação foi observado ao microscópio.

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris por 2 minutos e novamente lavadas em água corrente e destilada.

As lâminas foram imersas 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) e lavadas em seguida em água corrente e destilada.

As lâminas foram desidratadas em:

Etanol 80% por 30 segundos;

Etanol 95% por 30 segundos;

Etanol 100% 2 vezes por 30 segundos cada;

Xilol 4 vezes por 30 segundos cada.

As lâminas foram montadas em Entellan neu (Merck, cat# 1.07961, Alemanha).

Abaixo segue Quadro 5 com as características e especificações dos anticorpos utilizados.

Quadro 5 - Características e especificações dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Marca/Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Sistema de detecção	Controle positivo	Localização do antígeno	Uso para IHQ
VEGFR1	Abcam Clone Y103	1:50	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	placenta (bula: placenta)	Membrana e secretado	Sim
VEGFR2	Neomarkers Policlonal	1:50	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	placenta		
VEGFR3	Neomarkers Policlonal	1:400	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	placenta (bula: placenta ou câncer de mama)	membrana e citoplasma	Sim
PIGF	R&D Systems Policlonal	1:20	Calor úmido sob pressão em pH=9,0	Biotinylated Link Universal LSAB+	placenta (bula: usou em linhagem celular de ovário de hamster)	não cita	Western Blot
DLL4	Abcam Policlonal	1:200	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	rim (bula: pâncreas de camundongo; porém foto de IHQ em rim humano)	membrana	Sim
NOTCH1	Thermo Scientific Clone A6	1:50	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	placenta (sugestão da bula: pâncreas)	membrana, citoplasma e núcleo	Não cita
Integrina $\alpha 2\beta 1$	Abcam / 16B4	1:50	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	fibrossarcoma (bula: imunógeno: fibrossarcoma; controle positivo: HepG2 para imunofluorescência)	membrana	Sim (congelado)
Integrina $\alpha v\beta 3$	Abcam / BV4	1:25	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	cólon normal (bula: endotélio humano)	membrana	Sim
ILK (S246)	Abgent / Policlonal em coelho	1:100	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	câncer de pâncreas (bula: não cita; pâncreas citado pela marca Santa Cruz)	não cita	Sim
fosfo-FAK	Abcam / policlonal em coelho	1:50	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	cérebro (bula: cérebro)	membrana	Sim
PI3K p85 α	Abcam / policlonal em coelho	1:10	Calor úmido sob pressão em pH=6,0	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	músculo esquelético (bula: músculo esquelético)	não cita	Sim

4.6 ANÁLISE DA MARCAÇÃO

4.6.1 Análise por Imagem Digital

Imagens digitais das lâminas foram capturadas usando o equipamento Aperio Scan-Scope XT Slide Scanner (Aperio Technologies, Vista, CA, USA) sob lente objetiva com magnificação de 20x. Todos os *spots* (locais no TMA com área tumoral) foram avaliados visualmente no monitor. As áreas tumorais foram demarcadas para análise pelas patologistas Dra. Mariana Macedo Petaccia e Dras Patrícia Maria Peresi e pelo oncologista Dr. Tadeu Ferreira de Paiva Júnior.

No grupo de casos, os marcadores que foram analisados por imagem digital e os correspondentes locais pesquisados foram os seguintes: VEGFR1: membrana e citoplasma, VEGFR2: membrana e citoplasma, VEGFR3: membrana e citoplasma, PIGF em citoplasma, DLL4 em membrana e NOTCH1 em membrana e citoplasma.

O algoritmo utilizado para avaliar a marcação em membrana foi o *Membrane v1* e para citoplasma o *Positive Pixel Count* (citado abaixo).

Para cada anticorpo, o dois setores (setor 1 e setor 2) do TMA foram lidos, de forma que cada caso foi analisado em duplicata. Como resultado definitivo foi realizado a média dos resultados entre os 2 setores.

Os algoritmos empregados permitem a análise das variáveis abaixo listadas.

Membrane v1 - Marcação de Membrana

- Positividade em %
- Número total de células analisadas (NTC)

Positive Pixel Count - Marcação Citoplasmática

- Fortemente positiva
- Moderadamente positiva
- Fracamente positiva
- Intensidade média da marcação positiva
- Número total de negativos
- Área analisada
- Razão de positividade: N positivo/N total

4.6.2 Definições

A Marcação de Membrana

- **RESULTADO POSITIVO:** foi considerado resultado positivo aquele com intensidade de marcação igual a 2+ e mais 3+; exceto para DLL4, para o qual utilizou-se as intensidades 1+, 2+ e 3+. As percentagens de células com estas intensidades de marcação em cada *spot* foram somadas. Nos cálculos estatísticos, foi empregada a média dos valores obtidos em cada replicata. Quando apenas uma replicata era analisável (devido à perda de material num dos *spots*), utilizou-se o valor da replicata remanescente. Quando ambas as replicatas foram não analisáveis, foram realizados cortes inteiros para análise.
- **AMOSTRA NÃO REPRESENTATIVA:** aquela com menos de 500 células analisadas. Se esses casos não tinham o correspondente no outro setor com

NTC \geq 500 células, foram então submetidos a análise de corte inteiro e realizado leitura também no Aperio.

B Marcação citoplasmática

- **RESULTADO POSITIVO:** foi considerada para análise, a soma entre o número de *pixels* fortemente positivos e moderadamente positivos em cada *core*. Nos cálculos estatísticos, foi empregada a média dos valores obtidos em cada replicata. Quando apenas uma replicata era analisável (devido à perda de material num dos *cores*), utilizou-se o valor da replicata remanescente. Quando ambas as replicatas foram não analisáveis, empregamos os valores obtidos em cortes inteiros.
- **AMOSTRA NÃO REPRESENTATIVA:** aquela com área menor que $0.08\mu\text{m}^2$ (10% da área total do *core*). Se esses casos não tinham o correspondente no outro setor com área adequada, foram então submetidos a análise de corte inteiro e realizado leitura também no Aperio.

4.7 ANÁLISE VISUAL NO MICROSCÓPIO

No grupo casos, a marcação com os anticorpos contra integrina $\alpha 2\beta 1$, integrina $\alpha v\beta 3$, ILK, fosfo-FAK e PI3K p85 α , foi analisada num TMA para cada marcador (cada caso com duplicata), e no grupo de validação, a marcação com os anticorpos contra integrina $\alpha 2\beta 1$, ILK, FAK e PI3K p85 α , foi analisada em corte inteiro. Devido a problemas técnicos que impossibilitaram a análise digital no Aperio durante alguns períodos, foi decidido por realizar a análise através de um método

semiquantitativo, utilizando um escore (citado abaixo) já utilizado e padronizado previamente com o uso de integrinas por NETO et al. (2007).

A leitura foi realizada no microscópio óptico modelo Cx 31 da marca Olympus em objetiva de 10x / 0.25, pela patologista Dra. Patrícia Maria Peresi.

4.7.1 Definições

Os casos foram pontuados pela intensidade da marcação (de 0 a 3, sendo 0: ausente, 1: fraca, 2: moderada e 3: forte) e pela área da positividade (de 0 a 4, sendo 0: ausente, 1: área < 25%, 2: área entre 25% e < 50%, 3: área entre 50% e < 75% e 4: área \geq 75%). Para todos os casos foi calculado o produto da pontuação da intensidade pela pontuação da área, sendo então obtido o escore final, que variou entre 0 e 12. Os escores foram classificados segundo as definições seguintes: escore 0: negativo; escore 1 a 3: fraco; escore 4 a 8: moderado e escore 9 a 12: forte. Para fins estatísticos, os casos positivos foram considerados aqueles com escore final moderado (escore 4 a 8) e forte (escore 9 a 12).

No grupo dos casos, para os quais foi analisado o TMA, o resultado final foi obtido como uma média do escore (entre 0 e 12) do caso do setor 1 e setor 2 (duplicata) do TMA. Caso não houvesse material anátomo-patológico adequado em um dos setores, o resultado final foi o escore do caso no setor com material que pode ser avaliado.

No grupo de validação, o resultado final foi o único resultado obtido da análise realizada em corte inteiro.

4.8 DADOS CLÍNICOS COLETADOS

As informações clínicas coletadas foram resgatadas dos registros médicos arquivados no SAME e a partir do sistema de prontuário eletrônico MV 2000 empregado no hospital e consistiam de: data de nascimento, idade, sexo, comorbidades, data do diagnóstico, localização do tumor, grau histológico, invasão sanguínea, invasão linfática, invasão perineural, número de linfonodos comprometidos, número de linfonodos ressecados, TNM, estágio ao diagnóstico, data da recaída quando M0 ao diagnóstico, locais de metástases, *status* do *KRAS* (esse dado foi resgatado do registro no prontuário), cirurgia do tumor primário, radioterapia neoadjuvante, quimioterapia neoadjuvante, quimioterapia adjuvante, ressecção de metástases, linha da quimioterapia associada ao primeiro uso de bevacizumabe, *performance status* (ECOG) (**Quadro 6**) antes do início da quimioterapia associada ao bevacizumabe, tipo de quimioterapia associada ao bevacizumabe, linha de tratamento do bevacizumabe, quimioterapia para doença metastática em linhas prévias nos casos que o bevacizumabe foi utilizado em $\geq 2^a$ linha, presença de doença mensurável pré-início do bevacizumabe (casos sem doença mensurável ao início do bevacizumabe foram excluídos), data de início e término da quimioterapia e bevacizumabe, número mediano de ciclos de cada um, dose do bevacizumabe utilizada, melhor resposta atingida, método de imagem que detectou a melhor resposta, se ocorreu ou não progressão de doença e data, método de imagem utilizado para detectar a progressão, ocorrência de hipertensão, se houve uso de bevacizumabe em linhas posteriores, número de linhas utilizadas após progressão, data do último contato com o paciente e *status* do paciente no último contato.

Quadro 6 - Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status.

<i>Performance status</i>	Definição
0	Completamente ativo, sem restrições na performance.
1	Consegue realizar trabalho leve; paciente em nível ambulatorial; restrições para trabalho pesado.
2	Consegue realizar cuidados próprios, mas incapaz para realizar alguma atividade de trabalho. Permanece < 50% acamado ou restrito em cadeira.
3	Capacidade de realizar apenas alguns cuidados pessoais; confinado a cama ou cadeira > 50% do dia.
4	Não consegue realizar nenhum cuidado pessoal; completamente confinado ao leito ou cadeira.

4.8.1 Critérios de Avaliação de Hipertensão

Hipertensão foi definida como mensuração persistente (>24h) ou repetida de $\geq 140/90$ mmHg. Para graduar a hipertensão foi utilizado o CTCAE 4.03, conforme **Quadro 7**. Devido ao caráter retrospectivo do estudo, levou-se em conta as pressões anotadas em consultas médicas ou pela enfermagem na triagem das consultas ou triagem pré-quimioterapia, ou ainda início de medicação anti-hipertensiva.

Quadro 7 - Graduação da hipertensão

Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
Pré-hipertensão (PAS 120-139mmHg ou PAD 80-89mmHg)	PAS 140-159mmHg ou PAD 90-99mmHg; monoterapia indicada.	PAS ≥ 160 mmHg ou PAD ≥ 100 mmHg; combinação de drogas ou tratamento mais intenso que previamente indicado.	Consequências com potencial risco de vida (ex: hipertensão maligna, déficit neurológico transitório ou permanente, intervenção médica urgente indicada)	Morte

4.8.2 Critérios de Resposta

Foi utilizada a resposta anotada no prontuário pelo médico assistente. O Departamento de Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center utiliza os critérios de RECIST para avaliação de resposta como prática clínica diária. Porém, o investigador teve a liberdade de reclassificar a resposta como abaixo se necessário.

Segue como exemplo na **Quadro 8**, os critérios de RECIST 1.1 (EISENHAUER et al. 2009).

Quadro 8 - Critérios para resposta definidos pelo RECIST 1.1

Resposta completa (RC)	Desaparecimento de todas as lesões-alvo e redução dos linfonodos para $\leq 10\text{mm}$. Desaparecimento de todas lesões não alvo e normalização do marcador tumoral.
Resposta parcial (RP)	Redução $\geq 30\%$ da soma dos maiores diâmetros das lesões alvo
Doença estável (DE)	Sem critérios para RC, RP, nem PD. Lesões não alvo: persistência de uma ou mais lesões ou não normalização do marcador
Progressão de doença (PD)	Aumento $\geq 20\%$ de no mínimo 5mm na soma dos maiores diâmetros das lesões-alvo ou aumento de novas lesões incluindo detecção pelo PET-CT. Lesões não-mensuráveis: aumento significativo da carga tumoral (ex: aumento de derrame pleural de pequeno para volumoso; aumento de linfangite carcinomatosa de localizada para disseminada)

4.9 DEFINIÇÃO DOS DESFECHOS DE SOBREVIDA

- 1 **Sobrevida livre de progressão:** tempo entre início do tratamento com bevacizumabe e a primeira progressão registrada em prontuário ou data do último contato para aqueles que não apresentaram progressão da doença.
- 2 **Sobrevida global:** tempo entre o início tratamento com bevacizumabe e a data do último contato do paciente no hospital ou data do óbito.

A atualização mais recente dos dados, incluindo o *status* do paciente e da doença, foi realizada em dezembro de 2014.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregou-se estatística descritiva para descrição das características demográficas e clínico-patológicas da amostra estudada. Empregou-se frequências e percentagens para variáveis ordinais e nominais e a mediana com a variação para variáveis contínuas.

As taxas de respostas foram correlacionadas com os dados demográficos, clínicos, patológicos e imuno-histoquímicos por meio do teste de Qui-quadrado, ou exato de Fisher, quando necessário. Nos testes de associação com os marcadores imuno-histoquímicos, as variáveis analisadas foram dicotomizadas empregando-se o valor da mediana da intensidade ou do escore semi-quantitativo de expressão do respectivo marcador. Também foram realizados testes avaliando a associação da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos com resposta, considerando estas variáveis como contínuas, através do teste de Mann-Whitney.

Empregamos regressão logística para testar se algum dos fatores esteve relacionado de forma independente a taxa de resposta objetiva. Para essa análise, incluímos todas as variáveis que tiveram um $p \leq 0,05$ nos testes de associação.

As curvas de sobrevida foram calculadas por meio do método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste do log-rank. Foram censurados os casos perdidos para seguimento na data do último seguimento. As variáveis contínuas foram

dicotomizadas, empregando-se o valor da mediana, e as nominais ou ordinais agrupadas, quando necessário, para estas análises.

Foram avaliados os papéis das variáveis demográficas, patológicas e imuno-histoquímicas na sobrevida global e na sobrevida livre de progressão através de análise uni- e multivariada, empregando o método de riscos proporcionais de Cox. Na análise multivariada, entraram como covariáveis todas as variáveis com $p \leq 0,05$ na análise univariada.

O programa utilizado em todas as análises foi o IBM SPSS *statistics version* 21.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, sob o número 1134/08.

O projeto foi financiado pela FAPESP, número 2010/07858-2, e ganhou financiamento através da 2ª edição do Prêmio Professor Ricardo Renzo Brentani, edição 2014, organizado pelo A.C. Camargo Cancer Center.

5 RESULTADOS

5.1 GRUPO CASOS

5.1.1 Características Clínicas e Demográficas

Foram incluídos nas análises, ao final da etapa de seleção, 102 pacientes (Figura 21). O sexo masculino correspondeu a 57% dos pacientes. A idade mediana foi de 57 anos (28-80), e 51% apresentava alguma comorbidade.

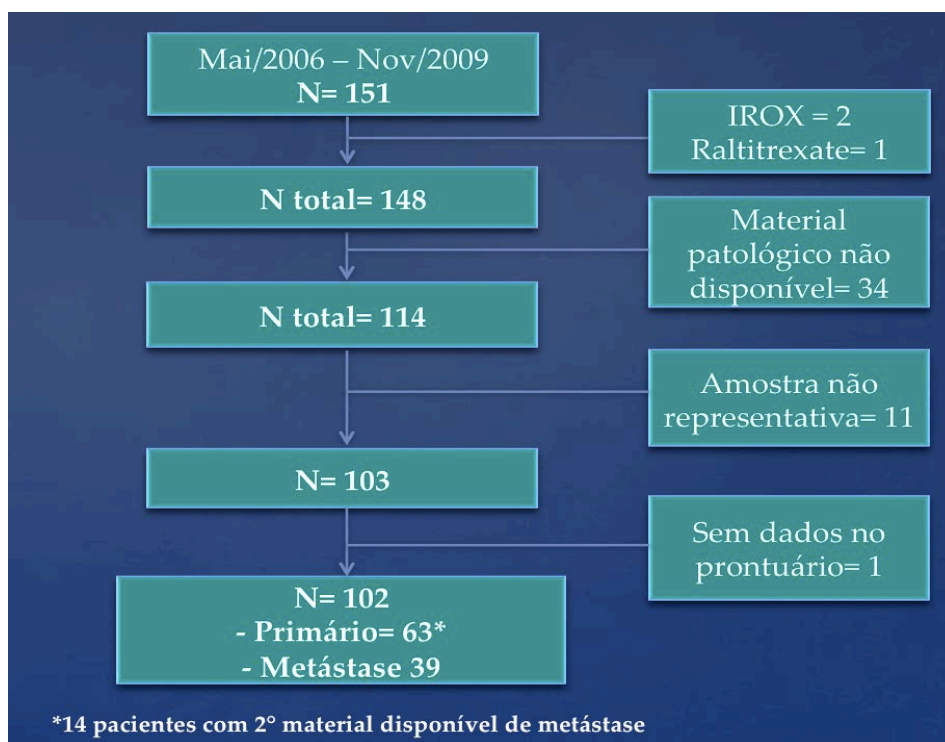


Figura 21 - Fluxograma com a seleção dos pacientes no grupo casos. Pacientes metastáticos que receberam bevacizumabe (N=102). Origem do material anátomo-patológico para análise: Primário N=63 (14 pacientes com 2º material disponível de metástase), metástase N=39.

A topografia do tumor primário foi intestino grosso esquerdo (distal à flexura esplênica) em 80% dos casos e intestino grosso direito (proximal à flexura esplênica) em 20% dos casos. A maioria dos tumores primários foi grau histológico 2 (80%).

Setenta e três por cento dos pacientes tinham tumores já metastáticos ao diagnóstico (metástase sincrônica). À época do início do bevacizumabe, metástase hepática estava presente em 66% dos 102 pacientes, pulmonar em 32% e peritoneal em 18%, apesar disso 97% apresentavam ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) *Performance Status* (ver Quadro 6) 0 ou 1 ao início do bevacizumabe. Em relação ao tratamento, 70% dos pacientes receberam o bevacizumabe em 1ª linha, enquanto 28% o fizeram em 2ª linha. FOLFIRI foi o esquema de quimioterapia mais frequentemente empregado (56%), seguido por FOLFOX (43%). Ressecção de metástase foi realizada em algum ponto do tratamento em 58% dos pacientes.

Todos os dados supracitados estão sumarizados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Características clínicas, demográficas e de tratamento.

Variável (N= número de pacientes com informação disponível)	
Idade em anos	
Mediana	57 (28-80)
Sexo (N= 102)	
Masculino	57%
Comorbidades (N= 102)	51%
Localização (N= 101)	
Intestino esquerdo	80%
Descendente / sigmóide / reto alto	57%
Reto médio – baixo	23%
Intestino direito	20%
Ascendente	17%
Transverso	3%
Classificação Histológica (N= 101)	
Adenocarcinoma não especificado	51%
Adenocarcinoma tubular	38%
Adenocarcinoma mucossecretor	5%
Adenocarcinoma mucinoso	4%
Adenocarcinoma células em anel de sinete	1%
Adenocarcinoma cribriforme	1%
Grau Histológico (N= 102)	
1	7%
2	80%
3	13%
Invasão sanguínea presente (N= 78)	17%
Invasão linfática presente (N= 77)	34%
Invasão perineural presente (N= 75)	31%
Invasão do tumor ao diagnóstico (N= 95)	
T1	2%
T2	6%
T3	75%
T4	16%
Tx	1%
Status linfonodal ao diagnóstico (N= 95)	
N0	30%
N1	34%
N2	35%
Nx	1%
Estádio ao diagnóstico (N=100)	
I	1%
II	12%
III	14%
IV	73%

Cont/ Tabela 1

Sítios de metástases ao início do bevacizumabe (N= 102)	
Fígado	66%
Pulmão	32%
Linfonodo	24%
Peritônio	18%
Pele / subcutâneo	1%
Recidiva loco-regional	12%
Cirurgia do tumor primário (N= 102)	95%
Radioterapia neoadjuvante (N= 101)	20%
Quimioterapia neoadjuvante (N= 101)	18%
Quimioterapia adjuvante (N= 102)	22%
(22 entre 28 com doença localizada ao diagnóstico)*	(79%)
Tipo da quimioterapia adjuvante (entre 23 pacientes que receberam)	
FOLFOX / FLOX	59%
5FU / Capecitabina	36%
Ressecção de metástases durante todo histórico do paciente (N= 102)	58%
Linha do bevacizumabe (N= 102)	
Primeira	70%
Segunda	28%
Terceira	1%
Quarta	1%
ECOG pré-bevacizumabe (N= 96)	
0	71%
1	26%
2	2%
3	1%
Presença de doença detectável pré início do bevacizumabe (N= 102)	91%
Quimioterapia associada ao bevacizumabe (N= 102)	
FOLFIRI	56%
FOLFOX	43%
FOLFOXIRI	1%
Ciclos de quimioterapia	
Mediana	11 (2-21)
Ciclos de bevacizumabe	
Mediana	10 (2-21)
Dose do bevacizumabe 5mg/Kg D1 e D15 (N= 102)	100%
Uso do bevacizumabe além da progressão, sem interrupção (N= 102)	9%
HAS (N= 99)	
0	67%
1	7%
2	12%
3	14%
4	0%
KRAS mutado éxon 2 (78)	41%

* Entre toda a população (N=105), 22% receberam quimioterapia adjuvante, porém entre os que poderiam receber (análise entre os que apresentavam EC I a III ao diagnóstico, porém com posterior recidiva) 79% receberam.

5.1.2 Desfechos Clínicos

A Variáveis Clínicas e patológicas e Correlação com Taxa de Resposta

Para avaliar a correlação de variáveis clínicas e patológicas habituais com taxa de resposta foram excluídos 9 pacientes que não apresentavam lesão detectável antes do início do bevacizumabe, impossibilitando avaliar o resultado do tratamento em termos de resposta, sendo então utilizada para esse fim a população de 93 pacientes, que corresponde àqueles com doença detectável pré-bevacizumabe. Dentre esses, em 95 foi obtida de fato a avaliação da resposta. A tomografia computadorizada foi o método utilizado em 70 pacientes (76%), seguido de ressonância magnética em 11 pacientes (12%), PET-CT em 8 pacientes (9%) e outros métodos em 3 pacientes (3%).

As seguintes variáveis estiveram associadas com maior resposta objetiva: histologia não produtora de mucina, grau 1 e 2 (versus 3), tumor primário localizado à esquerda (cólon descendente, sigmóide ou reto) e presença de metástase hepática (comparado com presença de metástase em outros sítios ou sem metástase hepática) (Tabela 2).

Tabela 2 - Associação da resposta objetiva com as variáveis clínicas e patológicas.

Variável	categoria	Resposta Objetiva		Total	p
		RC+RP	DE+PD		
Grau	1+2	45 (56)	35 (44)	80	0,01
	3	2 (17)	10 (83)	12	
Histologia produtora de mucina	não	45 (56)	36 (44)	81	0,04
	sim	2 (20)	8 (80)	10	
Localização do tumor primário	Direita	5 (26)	14 (74)	19	0,01
	Esquerda	42 (58)	30 (42)	72	
Metástase sincrônica	não	8 (33)	16 (67)	24	0,06
	sim	37 (56)	29 (44)	66	
Metástase hepática	não	7 (23)	23 (77)	30	<0,001
	sim	40 (65)	22 (35)	62	
Metástase pulmonar	não	34 (54)	29 (46)	63	0,41
	sim	13 (45)	16 (55)	29	
Metástase peritoneal	não	42 (55)	34 (45)	76	0,08
	sim	5 (31)	11 (69)	16	
ECOG	0	36 (60)	24 (40)	60	0,09
	1 a 4	11 (41)	16 (59)	27	
HAS	não	28 (48)	30 (52)	58	0,55
	sim	17 (55)	14 (45)	31	
Linha do uso do bevacizumabe	1	38 (59)	27 (41)	65	0,06
	2	9 (36)	16 (64)	25	
Quimioterapia	FOLFOX	22 (56)	17 (44)	39	0,43
	FOLFIRI	25 (48)	27 (52)	52	
KRAS	selvagem	25 (63)	15 (37)	40	0,18
	mutado	15 (47)	17 (53)	32	

*porcentagem relativa às linhas

B Desfechos Clínicos e Correlação com Sobrevida Livre de Progressão (SLP)

O tempo de seguimento mediano foi de 70,9 meses. A SLP mediana da população global (N=102 pacientes) foi de 9,8 meses (Figura 22).

Houve associação estatisticamente significativa entre maior SLP e ECOG 0 ou 1 ($p=0,03$), entretanto apenas 2 pacientes apresentaram ECOG 2 ou 3, o que compromete a validade desta análise; localização do tumor primário do lado esquerdo ($p=0,01$); ausência de metástase em linfonodo ($p=0,02$) e ter sido submetido à cirurgia do tumor primário ($p=0,001$) (Figura 23 A-D). Ressecção de metástase foi excluída dessa análise, para evitar o viés de alguns pacientes terem sido submetidos à ressecção em diversos momentos de todo o tratamento, incluindo após a progressão ao bevacizumabe.

Em relação ao *KRAS* houve apenas uma tendência a pior SLP para *KRAS* mutado (9 meses versus 11,8 meses, $p=0,06$).

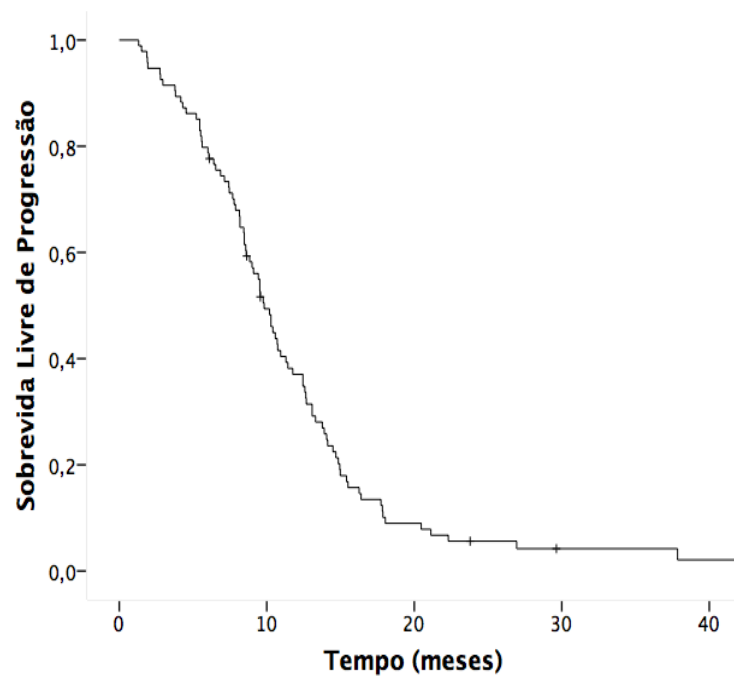


Figura 22 - Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) da amostra global (N=102 pacientes). A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. Sobrevida mediana foi de 9,8 meses.

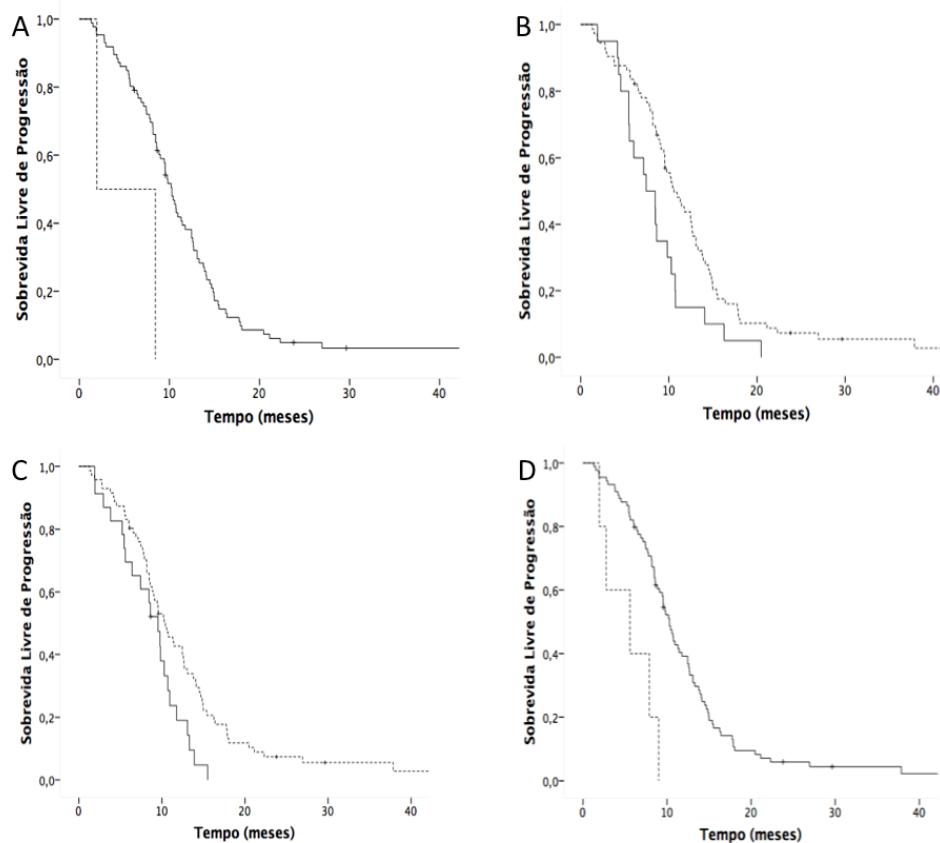


Figura 23 - Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) conforme características clínicas. As curvas foram calculada pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - ECOG 0 ou 1 (___) versus ECOG 2 a 4 (_ _ _); $p=0,03$. **B** - Localização do tumor primário: Esquerdo (_ _ _) versus Direito (___). $p=0,01$. **C** - Presença de metástase em linfonodo: Sim (___) x Não (_ _ _); $p=0,02$. **D** - Ressecção do tumor primário: Sim (___) x Não (_ _ _); $p=0,001$.

C Variáveis Clínicas e Correlação com Sobrevida Global (SG)

A SG mediana da população global (N=102 pacientes) foi de 24,9 meses (Figura 24).

Houve associação significativa entre maior SG e ECOG 0 ou 1 ($p<0,001$), contudo, novamente aqui o resultado deve ser encarado com cuidado em vista do pequeno número de pacientes com ECOG 2 ou 3, grau 1 ou 2 ($p=0,001$); metástase sincrônica ao diagnóstico ($p=0,008$); presença de metástase hepática versus outros sítios de metástase ($p<0,001$); ausência de metástase linfonodal ($p=0,007$); ser submetido à cirurgia do tumor primário versus tratamento com primário não operado ($p=0,02$); ressecção de metástase ($p<0,001$) e *KRAS* selvagem ($p=0,01$) (Figura 25 A-G).

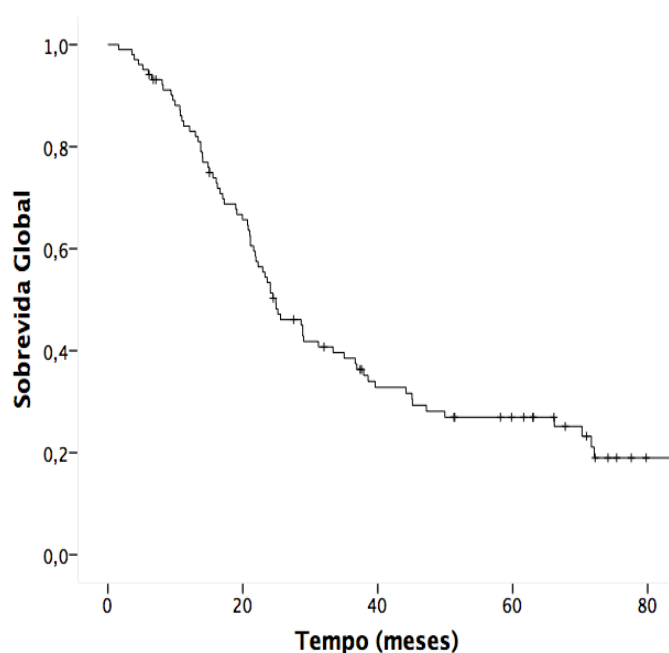


Figura 24 - Sobrevida global (SG) da amostra global (N=102 pacientes). A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. Sobrevida mediana foi de 24,9 meses

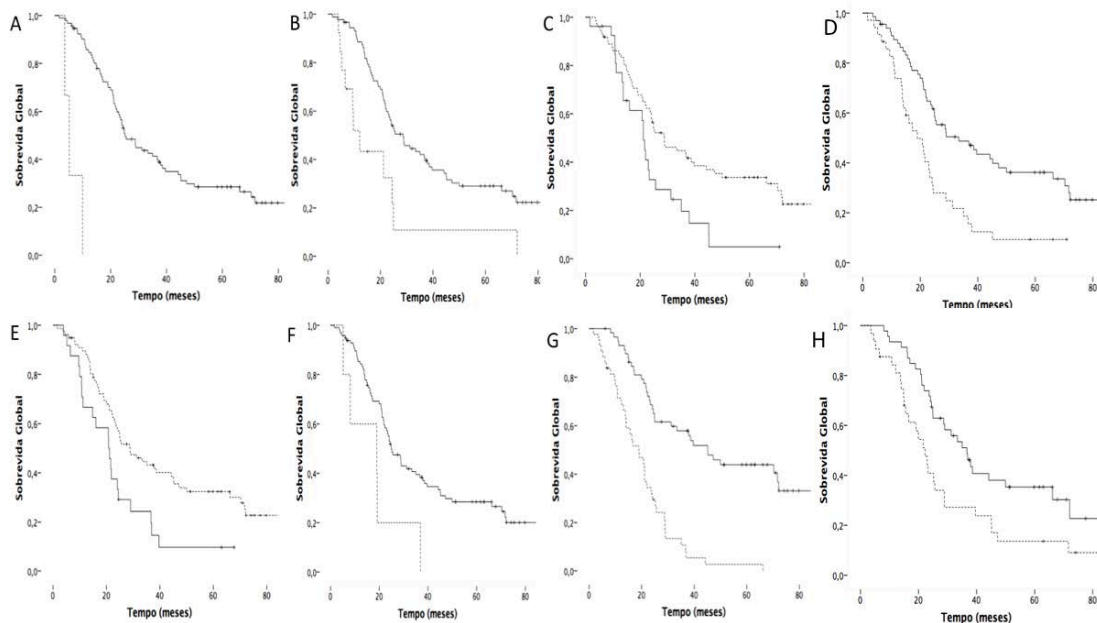


Figura 25 - Sobrevida global (SG) conforme as características clínicas. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - ECOG 0 ou 1 (___) x ECOG 2 a 4 (_ _ _); $p < 0,001$. **B** - Grau histológico bem diferenciado= Grau 1 + Moderadamente diferenciado= Grau 2 (___) x Pouco diferenciado= Grau 3 (_ _ _); $p = 0,001$. **C** - Presença de metástase sincrônica: sim (_ _ _) x não (___); $p = 0,008$. **D** - Presença de metástase hepática: sim (___) x não (_ _ _); $p < 0,001$. **E** - Presença de metástase linfonodal: sim (___) x não (_ _ _); $p = 0,007$. **F** - Ressecção do tumor primário: sim (___) x não (_ _ _); $p = 0,02$. **G** - Ressecção de metástases: sim (___) x não (_ _ _); $p < 0,001$. **H** - Status do gene *KRAS*: selvagem (___) x mutado (_ _ _); $p = 0,01$.

5.1.3 Análise da Influência da Expressão de Marcadores Imuno-Histoquímicos

Para os marcadores avaliados no Aperio, segue a Tabela 3 abaixo com os valores da mediana segundo o algoritmo de positividade para cada marcador (ver metodologia).

Tabela 3 - Mediana dos resultados positivos (ver definição em metodologia) para marcadores com leitura digital realizada no Aperio.

Marcador	Mediana	
	%	μm^2
VEGFR1 membrana	65	
VEGFR1 citoplasma		0,62
VEGFR2 membrana	10	
VEGFR2 citoplasma		0,23
VEGFR3 membrana	18	
VEGFR3 citoplasma		0,27
PIGF citoplasma		0,39
DLL4 membrana	26	
NOTCH1 membrana	69	
NOTCH1 citoplasma		0,86

Para os marcadores avaliados por análise visual no microscópio, segue Tabela 4 com percentual de pacientes considerados com escore moderado a forte (ver metodologia).

Tabela 4 - Percentual de casos positivos (ver definição em metodologia) para marcadores com análise visual no microscópio.

Marcador	Casos positivos
	%
Integrina $\alpha_2\beta_1$	84
Integrina $\alpha_v\beta_3$	81
ILK	90
fosfo-FAK	76
PI3K	89

A Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos e características anátomo-clínicas

Houve associação entre grau histológico 3 e expressão de VEGFR3 membrana (Tabela 5).

Houve associação entre metástase pulmonar e marcação para VEGFR1 na membrana, VEGFR1 no citoplasma, VEGFR3 na membrana e VEGFR3 no citoplasma. Metástase sincrônica (versus metacrônica) foi associada com menor expressão de VEGFR1 no citoplasma, VEGFR3 na membrana e PIGF. Localização do tumor primário no cólon direito esteve associado com marcação de NOTCH1 no citoplasma. HAS esteve associado à marcação de integrina $\alpha_v\beta_3$. Histologia produtora de mucina foi associada à menor expressão das integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ e fosfo-FAK, enquanto histologia não produtora de mucina à marcação para ILK e PI3K. Linfonodo positivo ao diagnóstico foi associado à marcação para PI3K. Metástase em peritônio esteve associada à ILK. Os demais marcadores e características clínicas não apresentaram associação significativa (Tabela 5).

Segue abaixo associação entre marcadores e características clínicas (Tabela 5).

Tabela 5 - Associação entre marcadores e características clínicas e patológicas.

Marcador	Expressão	Característica	p
VEGFR1 membrana	<input type="checkbox"/>	- Metástase em pulmão	0,004
VEGFR1 citoplasma	<input type="checkbox"/>	- Metástase sincrônica (versus metacrônica)	0,05
	<input type="checkbox"/>	- Metástase em pulmão	0,05
VEGFR3 membrana	<input type="checkbox"/>	- Metástase em pulmão	0,04
	<input type="checkbox"/>	- Metástase sincrônica (versus metacrônica)	0,03
	<input type="checkbox"/>	- Grau 3	0,009
VEGFR3 citoplasma	<input type="checkbox"/>	- Metástase em pulmão	0,04
PIGF	<input type="checkbox"/>	- Metástase sincrônica (versus metacrônica)	0,05
NOTCH1 citoplasma	<input type="checkbox"/>	- Cólon direito	0,04
Integrina $\alpha_2\beta_1$	<input type="checkbox"/>	- Histologia produtora de mucina	0,001
Integrina $\alpha_v\beta_3$	<input type="checkbox"/>	- Histologia produtora de mucina	0,01
	<input type="checkbox"/>	- HAS	<0,001
ILK	<input type="checkbox"/>	- Histologia não produtora de mucina	0,003
	<input type="checkbox"/>	- Metástase em peritônio	0,05
Fosfo-FAK	<input type="checkbox"/>	- Histologia produtora de mucina	0,02
PI3K	<input type="checkbox"/>	- Histologia não produtora de mucina	0,004
	<input type="checkbox"/>	- Linfonodo positivo ao diagnóstico	0,05

B Marcadores Imuno-Histoquímicos e Resposta Objetiva

Para avaliação de marcadores com resposta foi utilizada a população de 93 pacientes, aqueles com doença detectável pré-bevacizumabe, como citado previamente.

Não houve associação entre nenhum dos marcadores estudados e resposta objetiva (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação da resposta objetiva com os marcadores imuno-histoquímicos. Foi utilizado o teste do qui quadrado. Se > 20% das caselas tinham valores esperados abaixo de 5 ou algum valor esperado < 1 foi utilizado o teste exato de Fisher.

Variável	Categoria	Resposta Objetiva		Total	p
		RC+RP	DE+PD		
VEGFR1 membrana	<mediana	22 (50)	22 (50)	44	0,84
	>mediana	25 (52)	23 (48)	48	
VEGFR1 citoplasma	<mediana	23 (50)	23 (50)	46	0,75
	>mediana	24 (53)	21 (47)	45	
VEGFR2 membrana	<mediana	22 (48)	24 (52)	46	0,53
	>mediana	25 (54)	21 (46)	46	
VEGFR2 citoplasma	<mediana	23 (49)	24 (51)	47	0,75
	>mediana	22 (52)	20 (48)	42	
VEGFR3 membrana	<mediana	25 (53)	22 (47)	47	0,68
	>mediana	22 (49)	23 (51)	45	
VEGFR3 citoplasma	<mediana	25 (56)	20 (44)	45	0,53
	>mediana	22 (49)	23 (51)	45	
PIGF citoplasma	<mediana	26 (57)	20 (43)	46	0,34
	>mediana	20 (47)	23 (53)	43	
DLL4	<mediana	22 (51)	21 (49)	43	0,91
	>mediana	23 (50)	23 (50)	46	
NOTCH1 membrana	<mediana	26 (54)	22 (46)	48	0,54
	>mediana	21 (48)	23 (52)	44	
NOTCH1 citoplasma	<mediana	27 (56)	21 (44)	48	0,30
	>mediana	20 (46)	24 (54)	44	
Integrina $\alpha_2\beta_1$	negativo ou fraco moderado ou forte	4 (36)	7 (64)	11	0,40
		30 (50)	30 (50)	60	
Integrina $\alpha_v\beta_3$	negativo ou fraco moderado ou forte	7 (50)	7 (50)	14	0,74
		34 (55)	28 (45)	62	
ILK	negativo ou fraco moderado ou forte	1 (20)	2 (80)	3	0,36
		36 (51)	34 (49)	70	
Fosfo-FAK	negativo ou fraco moderado ou forte	6 (38)	10 (62)	16	0,24
		33 (54)	28 (46)	61	
PI3K	negativo ou fraco moderado ou forte	3 (38)	5 (62)	8	0,48
		35 (52)	32 (48)	67	

*percentagem relativa às linhas

C Associação entre SLP e Marcadores Imuno-Histoquímicos

Houve associação entre maior SLP e marcação (>mediana) de VEGFR2 no citoplasma ($p=0,03$), marcação moderada ou forte de integrina $\alpha_v\beta_3$ ($p=0,03$), marcação moderada ou forte de ILK ($p=0,02$) e marcação moderada ou forte de PI3K ($p=0,01$) (Figura 26).

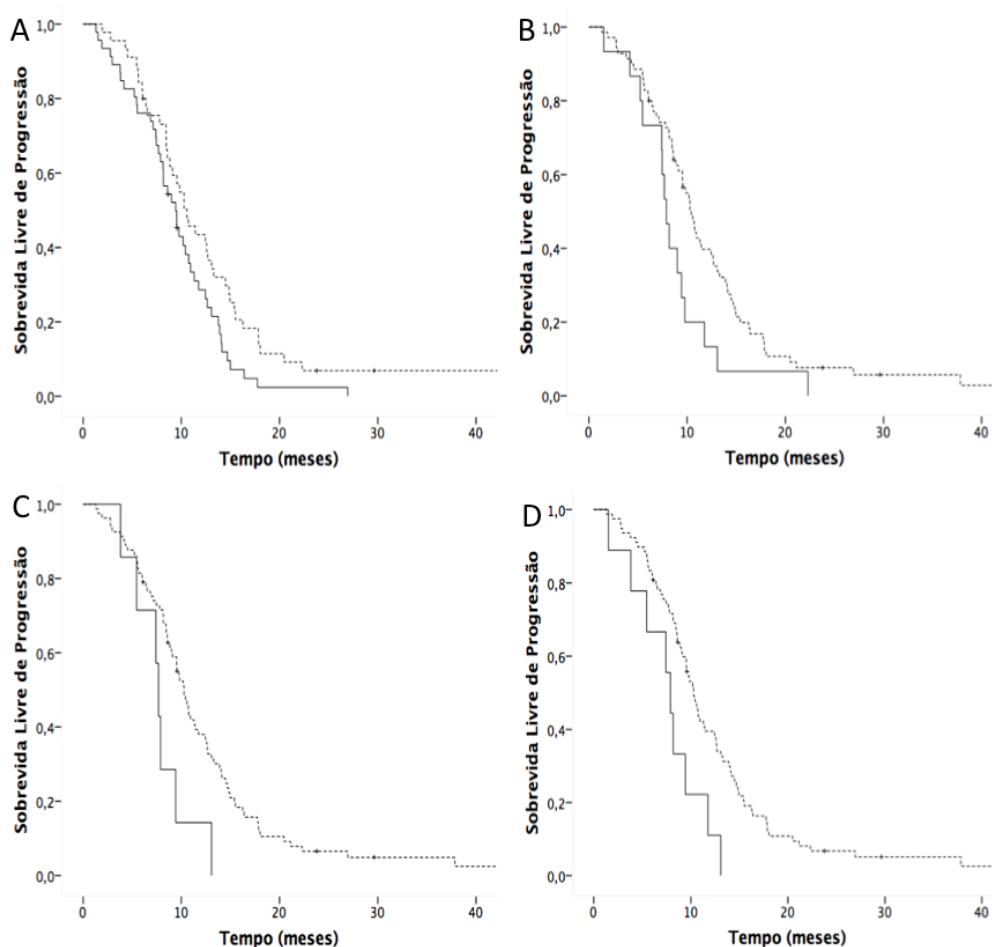


Figura 26 - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme expressão de marcadores.

As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - VEGFR2 no citoplasma. <mediana (___) x >mediana (___); $p=0,03$. **B** - Integrina $\alpha_v\beta_3$. Negativo ou fraco (___) x moderado ou forte (___). Escore 0: negativo; escore 1 a 3: fraco; escore 4 a 8: moderado e escore 9 a 12: forte. $p=0,03$. **C** - ILK. Negativo ou fraco (___) x moderado ou forte (___). Escore 0: negativo; escore 1 a 3: fraco; escore 4 a 8: moderado e escore 9 a 12: forte. $p=0,02$. **D** - PI3K. Negativo ou fraco (___) x moderado ou forte (___). Escore 0: negativo; escore 1 a 3: fraco; escore 4 a 8: moderado e escore 9 a 12: forte. $p=0,01$.

D Associação entre SG e Marcadores Imuno-Histoquímicos

Houve associação significativa entre maior SG e baixa expressão (<mediana) de NOTCH1 ($p=0,04$), hiperexpressão (marcação moderada ou forte) de integrina $\alpha_2\beta_1$, $p=0,04$ e hiperexpressão (marcação moderada ou forte) de PI3K, $p=0,02$ (Figura 27).

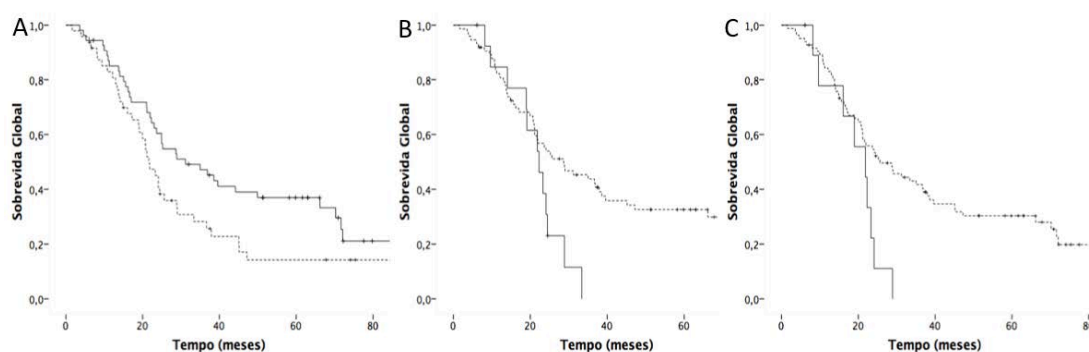


Figura 27 - Sobrevida global (SG) conforme expressão de marcadores. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - NOTCH1. < mediana (—) x > mediana (_ _ _); $p=0,04$. **B** - Integrina $\alpha_2\beta_1$. Negativo ou fraco (—) x moderado ou forte (_ _ _). Escore 0: negativo; escore 1 a 3: fraco; escore 4 a 8: moderado e escore 9 a 12: forte. $p=0,04$. **C** - PI3K. Negativo ou fraco (—) x moderado ou forte (_ _ _). Escore 0: negativo; escore 1 a 3: fraco; escore 4 a 8: moderado e escore 9 a 12: forte. $p=0,02$.

E Análise de eficácia no subgrupo VEGFR2 / NOTCH1

Devido os resultados encontrados individualmente com VEGFR2 e NOTCH1, realizamos análise combinada com resultados de ambos.

Não houve diferença em taxa de resposta, entretanto, houve maior SLP ($p=0,05$) (Figura 28) e SG ($p=0,02$) (Figura 29) para pacientes com VEGFR2 membrana positivo e NOTCH1 negativo versus VEGFR2 membrana negativo e NOTCH1 positivo.

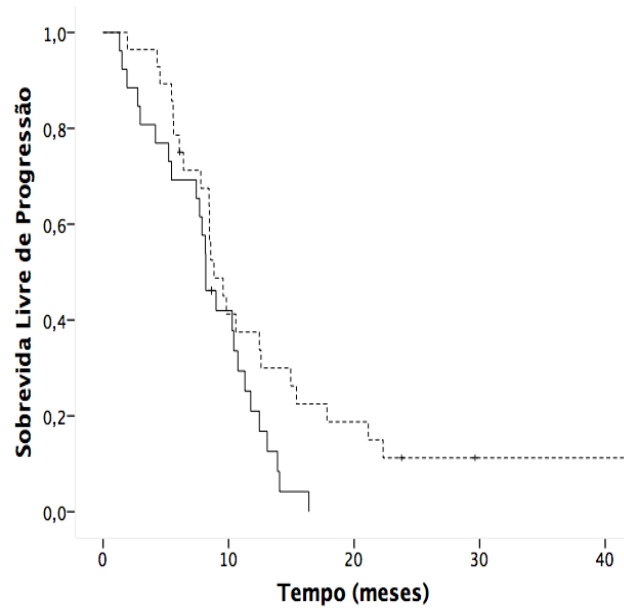


Figura 28 - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme expressão de VEGFR2 membrana e NOTCH1. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. VEGFR2 membrana negativo e NOTCH1 positivo (___) x VEGFR2 membrana positivo e NOTCH1 negativo (_ _ _). $p=0,05$.

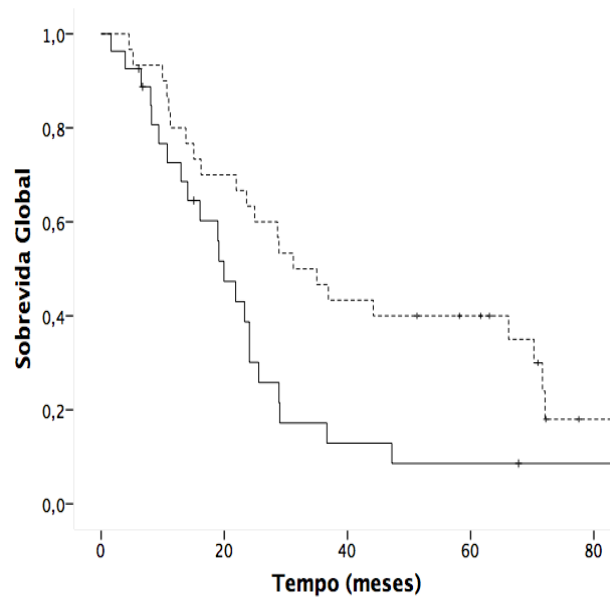


Figura 29 - Sobrevida global (SG) conforme expressão de VEGFR2 membrana e NOTCH1. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. VEGFR2 membrana negativo e NOTCH1 positivo (___) x VEGFR2 membrana positivo e NOTCH1 negativo (_ _ _). $p=0,02$.

Não houve diferença significativa em TR, SLP e SG entre a comparação VEGFR2 citoplasma positivo e NOTCH1 negativo versus VEGFR2 citoplasma negativo e NOTCH1 positivo.

F Associação entre os marcadores Imuno-Histoquímicos

Todos os VEGFRs se correlacionaram entre si. PlGF esteve associado com VEGFR1, NOTCH1, integrinas, ILK e FAK. Não houve associação de DLL4 com nenhum marcador. NOTCH membrana esteve associado a expressão no citoplasma de VEGFR 2 e 3, porém não na membrana, além de estar associado a integrinas e FAK. NOTCH citoplasma foi associado a todos os marcadores, exceto DLL4. Integrinas estiveram associadas a ILK, FAK e PI3K, além das associações citadas acima. ILK também foi associado a FAK e PI3K, além das associações citadas acima. FAK e PI3K também estiveram associados, além de outras associações citadas acima com esses marcadores.

Segue abaixo tabela com associação dos marcadores entre si (**Quadro 9**).

Quadro 9 - Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos. Foi utilizado o teste do qui quadrado. Se > 20% das caselas tinham valores esperados abaixo de 5 ou valor esperado < 1 foi utilizado o teste exato de Fisher.

	VGFR1 Memb	VEGFR1 Citop	VGFR2 Memb	VEGFR2 Citop	VGFR3 Memb	VEGFR3 Citop	PIGF	DLL4	NOTCH1 Memb	NOTCH1 Citop	Integrina $\alpha_2\beta_1$	Integrina $\alpha_v\beta_3$	ILK	Fosfo- FAK	PI3K
VGFR1 Memb	-	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.001	NS	NS	0.01	0.04	NS	NS	0.01	0.04
VEGFR1 Citop	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS	<0.001	0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001
VGFR2 Memb	<0.001	<0.001	-	<0.001	0.002	0.007	NS	NS	NS	0.05	0.02	0.01	0.01	0.003	<0.001
VEGFR2 Citop	0.001	<0.001	<0.001	-	0.001	<0.001	NS	NS	0.005	0.002	0.003	0.001	0.03	<0.001	0.001
VGFR3 Memb	<0.001	<0.001	0.002	0.001	-	<0.001	NS	NS	NS	0.03	NS	NS	NS	NS	NS
VEGFR3 Citop	<0.001	<0.001	0.007	<0.001	<0.001	-	0.04	NS	0.003	0.007	NS	NS	NS	NS	NS
PIGF	0.001	<0.001	NS	NS	NS	0.04	-	NS	NS	<0.001	0.03	0.03	0.01	0.005	NS
DLL4	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
NOTCH1 Memb	NS	NS	NS	0.005	NS	0.003	NS	NS	-	0.01	0.005	0.001	NS	0.02	NS
NOTCH1 Citop	0.01	<0.001	0.05	0.002	0.03	0.007	<0.001	NS	0.01	-	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
Integrina $\alpha_2\beta_1$	0.04	0.001	0.02	0.003	NS	NS	0.03	NS	0.005	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Integrina $\alpha_v\beta_3$	NS	<0.001	0.01	0.001	NS	NS	0.03	NS	0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001
ILK	NS	0.001	0.01	0.03	NS	NS	0.01	NS	NS	0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001	<0.001
Fosfo-FAK	0.01	0.001	0.003	<0.001	NS	NS	0.005	NS	0.02	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-	<0.001
PI3K	0.04	<0.001	<0.001	0.001	NS	NS	NS	NS	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-

5.1.4 Regressão Logística para Resposta Objetiva

Na regressão logística para taxa de resposta objetiva foram incluídas as variáveis: grau histológico, localização do tumor primário (direita versus esquerda), histologia agrupada (produtora de mucina x não) e presença de metástase hepática (sim x não).

Apenas localização do tumor primário (direita versus esquerda) e metástase hepática (versus metástase em outros sítios) estiveram independentemente associados com taxa de resposta (Tabela 7).

Tabela 7 - Regressão logística mostrando variáveis que se mostraram associadas com taxa de resposta objetiva de maneira independente. Foram incluídos nesta análise 90 casos, com 47 eventos, para os quais todos os dados analisados estavam presentes.

Covariáveis	OR	IC 95%	p
Localização do tumor primário			
Direita	0,26	0,08-0,86	0,03
Esquerda	1		
Metástase hepática			
Sim	3,99	1,36-11,73	0,01
Não (metástase em outros sítios)	1		
Histologia			
Produtor de mucina	0,57	0,09 – 3,61	0,55
Outras histologias	1		
Grau			
1 e 2	4,11	0,73 - 23,07	0,11
3	1		

5.1.5 Análise Multivariada para Sobrevida Livre de Progressão

Realizamos análise multivariada com método de regressão de Cox para determinação de variáveis independentemente associadas com SLP. Entraram na análise as variáveis localização do tumor primário (direita x esquerda), expressão citoplasmática de VEGFR2 (<mediana x >mediana), expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ (moderado a forte versus negativo a fraco), expressão de ILK (moderado a forte

versus negativo a fraco) e expressão de PI3K (moderado a forte versus negativo a fraco). A variável ECOG não entrou pelo número reduzido de pacientes. Ressecção de metástase não entrou na análise, pois esta aconteceu em momentos diversos em relação ao uso do bevacizumabe.

Apenas localização do tumor primário (direita versus esquerda) esteve independentemente associada com maior SLP (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise multivariada para sobrevida livre de progressão. Foram incluídos nesta análise 81 casos, com 75 eventos, para os quais todos os dados analisados estavam presentes.

Covariáveis	HR	IC 95%	p
Localização do tumor primário			
Direita	1		0,01
Esquerda	0,5	0,29 – 0,86	
VEGFR2 citoplasmático			
>0,23 μm^2	0,62	0,38 – 1,02	0,06
<0,23 μm^2	1		
ILK			
Moderado a forte	0,86	0,29 - 5,30	0,76
Negativo a fraco	1		
PI3K			
Moderado a forte	0,68	0,16 – 2,95	0,61
Negativo a fraco	1		
Integrina $\alpha_2\beta_3$			
Moderado a forte	0,73	0,29 - 1,85	0,50
Negativo a fraco	1		

5.1.6 Análise Multivariada para Sobrevida Global

Realizamos análise multivariada com método de regressão de Cox para determinação de variáveis independentemente associadas com SG. Entraram na análise as variáveis ressecção de metástases (sim x não), metástase hepática (sim x não), grau histológico (1+2 x 3), metástase sincrônica (EC I a III versus EC IV ao diagnóstico), NOTCH membrana (> mediana versus < mediana), Integrina $\alpha_2\beta_1$ (negativo a fraco versus moderado a forte) e PI3K (negativo a fraco versus moderado

a forte). A variável ECOG não entrou pelo número reduzido de pacientes. A variável *KRAS* não foi utilizada pelo potencial viés do uso de terapia anti-EGFR.

Estiveram associados de maneira independente com SG o grau histológico e ressecção de metástase (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise multivariada mostrando variáveis que se mostraram associadas com sobrevida global (SG) de maneira independente. Foram incluídos nesta análise 86 casos, com 61 eventos, para os quais todos os dados analisados estavam presentes.

Covariáveis	HR	IC 95%	p
Metástase hepática			
Sim	1		0,48
Não (metástase em outros sítios)	1,24	0,68-2,25	
Grau histológico			
1+ 2	1		0,005
3	3,03	1,39-6,56	
Metástase sincrônica ao diagnóstico			
Não (metástase metacrônica)	1		0,06
Sim	0,54	0,28-1,03	
Ressecção de metástase			
Sim	1		<0.001
Não	4,85	2,69 – 8,73	
NOTCH1 membrana			
<69%	1		0,14
>69%	1,54	0,87 – 2,71	
Integrina $\alpha_2\beta_1$			
negativo a fraco	1		0,76
moderado a forte	0,84	0,27 - 2,61	
PI3K			
negativo a fraco	1		0,51
moderado a forte	0,66	0,19 a 2,25	

5.1.7 Correlação da mutação *KRAS* com Características Patológicas e Desfecho

Como citado previamente, *KRAS* mutado no éxon 2 esteve presente em 41% dos 102 pacientes.

Não houve associação do *status* mutacional do *KRAS* com sexo, localização do tumor primário, histologia, grau histológico, metástase sincrônica ou metacrônica, sítio de metástase (hepática, pulmonar, linfonodal ou peritônio), ressecção de metástase e desenvolvimento de HAS.

Não houve associação do *status* do *KRAS* com a expressão de nenhum dos marcadores imuno-histoquímicos avaliados.

Presença de mutação do *KRAS* não esteve associada a taxa de resposta, mas houve uma tendência a pior SLP (9 meses versus 11,8 meses, $p=0,06$) e foi associado com pior SG (22 meses, *KRAS* mutado, versus 37 meses, *KRAS* selvagem, $p=0,01$).

5.1.8 Análise do Material Anátomo-Patológico Oriundo do Tumor Primário Versus de Metástase

Ao todo, entre os 102 pacientes, 63 o material anátomo-patológico era do tumor primário e em 39 era do sítio metastático.

A expressão (>mediana) de NOTCH1 no citoplasma foi mais frequente no tumor primário do que na metástase (74% versus 26% respectivamente, $p=0,01$). No mesmo sentido, a expressão (moderado a forte) de integrina $\alpha_2\beta_1$ foi mais frequente no tumor primário do que na metástase (70% versus 30% respectivamente, $p=0,03$) (teste do qui quadrado).

Os demais marcadores, VEGFR1 na membrana, VEGFR1 no citoplasma, VEGFR2 na membrana, VEGFR2 no citoplasma, VEGFR3 na membrana, VEGFR3 no citoplasma, PIGF, DLL4, NOTCH1 na membrana, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, fosfo-FAK e PI3K não tiveram diferença significativa de expressão entre o tumor primário e a metástase.

Entre os 14 pacientes que tinham material pareado disponível de tumor primário e metástase, foi realizada a avaliação de integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, fosfo-FAK e PI3K. Não houve diferença na expressão desses marcadores entre o tumor primário e a metástase (teste de Wilcoxon).

5.1.9 Análise dos Pacientes que Receberam Bevacizumabe em Primeira Linha de Tratamento

Com finalidade de avaliar uma população mais homogênea, optamos por analisar os 71 pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha de tratamento.

O sexo masculino correspondeu a 55% dos pacientes. A idade mediana foi de 56 anos (28-80). A topografia do tumor primário foi intestino grosso esquerdo (distal à flexura esplênica) em 83% dos casos e intestino grosso direito (proximal à flexura esplênica) em 17% dos casos. A maioria dos tumores primários foi grau histológico 2 (85%).

Setenta e três por cento dos pacientes tinham tumores já metastáticos ao diagnóstico (metástase sincrônica). À época do início do bevacizumabe, metástase hepática estava presente em 69% dos 71 pacientes, pulmonar em 27% e peritoneal em 20%. ECOG *Performance Status* (ver Quadro 6) 0 ou 1 foi presente em 99% dos

pacientes ao início do bevacizumabe. Em relação ao tratamento, FOLFOX foi o esquema de quimioterapia mais frequentemente empregado (58%), seguido por FOLFIRI (42%). Ressecção de metástase foi realizada em algum ponto do tratamento em 58% dos pacientes.

Todos os dados supracitados estão sumarizados na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10 - Características clínicas, demográficas e de tratamento dos pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.

Variável (N= número de pacientes com informação disponível)	
Idade em anos	
Mediana	56 (28-80)
Sexo (N= 71)	
Masculino	55%
Localização (N= 71)	
Intestino esquerdo	83%
Descendente / sigmóide / reto alto	59%
Reto médio – baixo	24%
Intestino direito	17%
Ascendente	14%
Transverso	3%
Classificação Histológica (N= 70)	
Adenocarcinoma não especificado	49%
Adenocarcinoma tubular	46%
Adenocarcinoma mucossecretor	3%
Adenocarcinoma mucinoso	3%
Adenocarcinoma células em anel de sinete	0%
Adenocarcinoma cribriforme	0%
Grau Histológico (N= 71)	
1	7%
2	85%
3	8%
Estádio ao diagnóstico (N=70)	
I	0%
II	16%
III	11%
IV	73%
Sítios de metástases ao início do bevacizumabe (N= 71)	
Fígado	69%
Pulmão	27%
Linfonodo	20%
Peritônio	20%
Recidiva loco-regional	10%

Cirurgia do tumor primário (N= 71)	96%
Radioterapia neoadjuvante (N= 71)	21%
Quimioterapia neoadjuvante (N= 71)	20%
Quimioterapia adjuvante (N= 71)	23%
(16 entre 20 com doença localizada ao diagnóstico)*	(80%)
Tipo da quimioterapia adjuvante (entre 16 pacientes que receberam)	
FOLFOX / FLOX	75%
5FU / Capecitabina	19%
Ressecção de metástases durante todo histórico do paciente (N= 71)	56%
ECOG pré-bevacizumabe (N= 68)	
0	75%
1	24%
2	0%
3	1%
Presença de doença detectável pré início do bevacizumabe (N= 65)	92%
Quimioterapia associada ao bevacizumabe (N= 71)	
FOLFOX	58%
FOLFIRI	42%
Ciclos de quimioterapia	
Mediana	12 (2-21)
Ciclos de bevacizumabe	
Mediana	11 (2-21)
Dose do bevacizumabe 5mg/Kg D1 e D15 (N= 71)	100%
Uso do bevacizumabe além da progressão, sem interrupção (N= 71)	9%
HAS (N= 68)	
0	68%
1	4%
2	13%
3	15%
4	0%
KRAS mutado éxon 2 (56)	36%

A Desfechos Clínicos

• Variáveis Clínicas e patológicas e Correlação com Taxa de Resposta

Para avaliar a correlação de variáveis clínicas e patológicas habituais com taxa de resposta foram excluídos 6 pacientes que não apresentavam lesão detectável antes do início do bevacizumabe, impossibilitando avaliar o resultado do tratamento em termos de resposta.

Entre os 65 pacientes nos quais fora obtida a avaliação de resposta, a tomografia computadorizada foi o método utilizado em 48 pacientes (74%), seguido

de ressonância magnética em 8 pacientes (12%), PET-CT em 7 pacientes (11%) e outros métodos em 2 pacientes (3%).

As seguintes variáveis estiveram associadas com maior resposta objetiva: metástase sincrônica (versus metacrônica), tumor primário localizado à esquerda (cólon descendente, sigmóide ou reto) e presença de metástase hepática (comparado com presença de metástase em outros sítios ou sem metástase hepática) (Tabela 11).

Tabela 11 - Associação da resposta objetiva com as variáveis clínicas e patológicas nos pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.

Variável	categoria	Resposta Objetiva		Total	p
		RC+RP	DE+PD		
Grau	1+2	37 (63)	22 (37)	59	0,07
	3	1 (17)	5 (83)	6	
Histologia produtora de mucina	não	36 (60)	24 (40)	60	0,54
	sim	2 (50)	2 (50)	4	
Localização do tumor primário	Direita	3 (27)	8 (73)	11	0,04
	Esquerda	35 (65)	19 (35)	54	
Metástase sincrônica	não	6 (35)	11 (65)	17	0,03
	sim	31 (66)	16 (34)	47	
Metástase hepática	não	6 (33)	12 (67)	18	0,01
	sim	32 (68)	15 (32)	47	
Metástase pulmonar	não	30 (63)	18 (37)	48	0,27
	sim	8 (47)	9 (53)	17	
Metástase peritoneal	não	33 (62)	20 (38)	53	0,21
	sim	5 (42)	7 (58)	12	
ECOG	0	30 (67)	15 (33)	45	0,16
	1 a 4	8 (47)	9 (53)	17	
HAS	não	22 (51)	21 (49)	43	0,09
	sim	14 (74)	5 (26)	19	
Quimioterapia	FOLFOX	22 (61)	14 (39)	36	0,63
	FOLFIRI	16 (55)	13 (45)	29	
KRAS	selvagem	22 (67)	11 (33)	33	0,23
	mutado	10 (50)	10 (50)	20	

*porcentagem relativa às linhas

- **Desfechos Clínicos e Correlação com Sobrevida Livre de Progressão (SLP)**

O tempo de seguimento mediano foi de 66,1 meses. A SLP mediana da população global (N=71 pacientes) foi de 10,7 meses (Figura 30).

Houve associação estatisticamente significativa entre maior SLP e grau histológico 1 e 2 versus 3 ($p=0,04$), ter sido submetido à cirurgia do tumor primário ($p<0,001$) e ter desenvolvido HAS durante o tratamento com bevacizumabe ($p=0,02$) (Figura 31). Ressecção de metástase foi excluída dessa análise, para evitar o viés de alguns pacientes terem sido submetidos à ressecção em diversos momentos de todo o tratamento, incluindo após a progressão ao bevacizumabe.

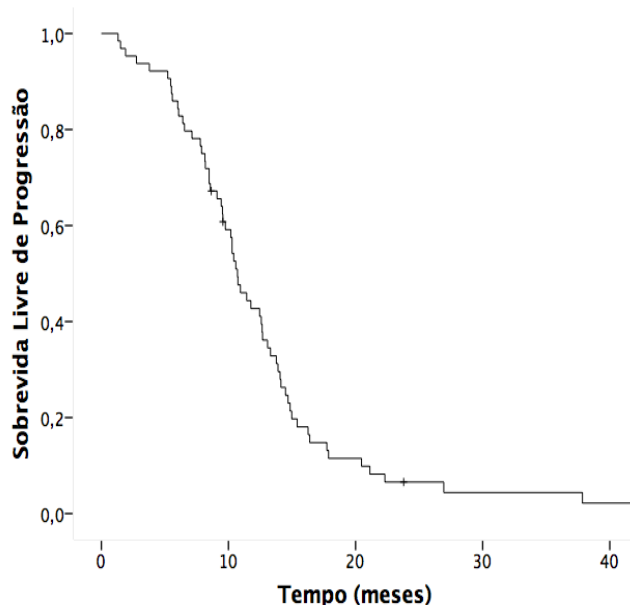


Figura 30 - Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) da amostra de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha (N=71 pacientes). A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. Sobrevida mediana foi de 10,7 meses.

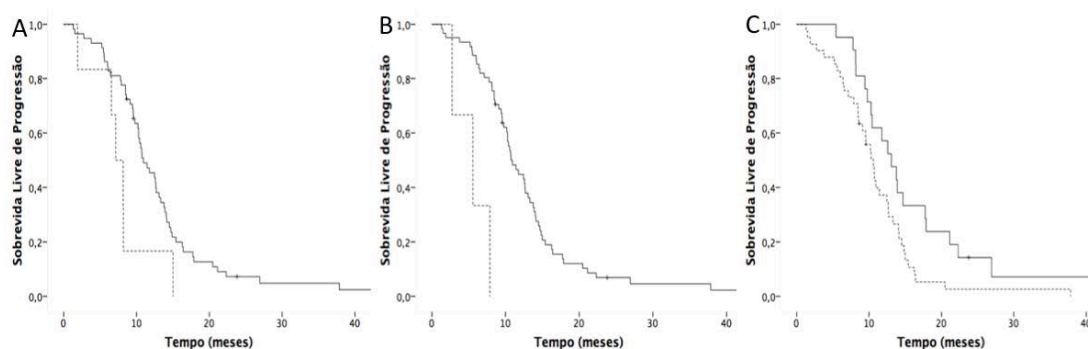


Figura 31- Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme as características clínicas de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - Grau histológico: Bem diferenciado= Grau 1 + Moderadamente diferenciado= Grau 2 (___) x Pouco diferenciado= Grau 3 (___); $p=0,04$. **B** - Ressecção do tumor primário: Sim (___) x Não (___); $p<0,001$. **C** - Desenvolvimento de HAS durante o uso de bevacizumabe: Sim (___) x Não (___); $p=0,02$.

- **Variáveis Clínicas e Correlação com Sobrevida Global (SG)**

A SG mediana da população global (N=71 pacientes) foi de 29 meses (Figura 32).

Houve associação significativa entre maior SG e grau 1 ou 2 ($p=0,003$), metástase sincrônica ao diagnóstico ($p=0,003$), presença de metástase hepática versus outros sítios de metástase ($p=0,004$), ausência de metástase pulmonar ($p=0,03$) e ressecção de metástase ($p<0,001$) (Figura 33).

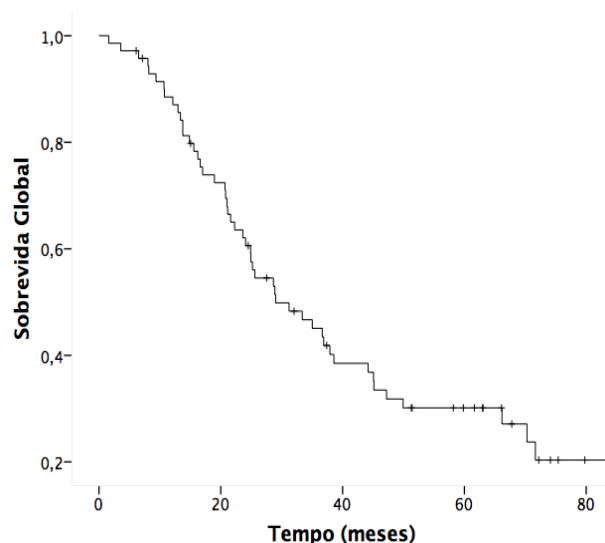


Figura 32 - Sobrevida global (SG) da amostra de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha (N=71 pacientes). A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. Sobrevida mediana foi de 29 meses.

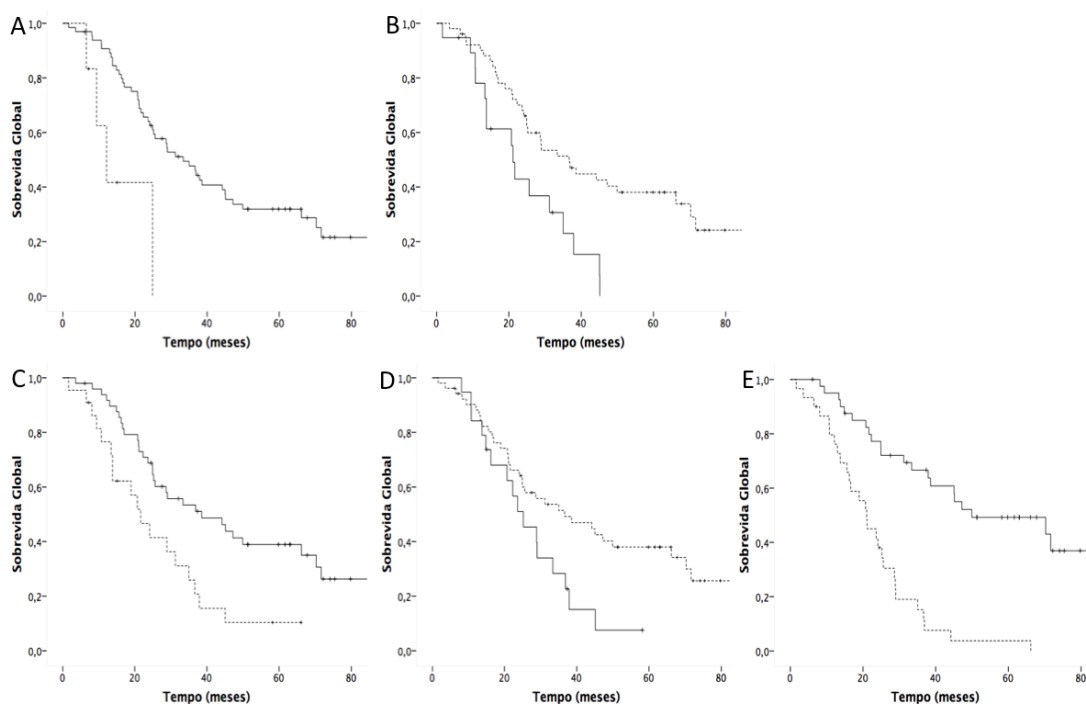


Figura 33 - Sobrevida global (SG) conforme as características clínicas de pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - Grau histológico: Bem diferenciado= Grau 1 + Moderadamente diferenciado= Grau 2 (___) x Pouco diferenciado= Grau 3 (_ _); $p=0,002$. **B** - Presença de metástase sincrônica (EC I, II ou III ao diagnóstico com metástase metacrônica versus EC IV ao diagnóstico): Sim (_ _) x não (___); $p=0,003$. **C** - Presença de metástase hepática. Sim (___) x Não (_ _); $p=0,004$. **D** - Presença de metástase pulmonar: Sim (___) x Não (_ _); $p=0,03$.

B Análise da Influência da Expressão de Marcadores Imuno-Histoquímicos

Para os marcadores avaliados no Aperio, segue a Tabela 12 abaixo com os valores da mediana segundo o algoritmo de positividade para cada marcador (ver metodologia) e percentual de casos positivos.

Tabela 12 - Mediana dos resultados positivos (ver definição em metodologia) para marcadores com leitura digital realizada no Aperio entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.

Marcador (N= material disponível)	Mediana	
	%	μm^2
VEGFR1 membrana (71)	65	
VEGFR1 citoplasma (71)		0,63
VEGFR2 membrana (71)	10	
VEGFR2 citoplasma (68)		0,23
VEGFR3 membrana (71)	16	
VEGFR3 citoplasma (71)		0,27
PIGF citoplasma (70)		0,41
DLL4 membrana (69)	28	
NOTCH1 membrana (71)	68	
NOTCH1 citoplasma (71)		0,87

Para os marcadores avaliados por análise visual no microscópio, segue Tabela 13 com percentual de pacientes considerados escore moderado a forte (ver metodologia).

Tabela 13 - Percentual de casos positivos (ver definição em metodologia) para marcadores com análise visual no microscópio entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.

Marcador (N= material disponível)	Casos positivos (%)
Integrina $\alpha_2\beta_1$ (62)	89
Integrina $\alpha_v\beta_3$ (64)	86
ILK (65)	94
fosfo-FAK (62)	79
PI3K (65)	92

- **Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos e características anátomo-clínicas**

Houve associação entre grau 3 e baixa expressão de VEGFR3 na membrana ($p=0,02$), expressão de VEGFR1 na membrana e metástase metacrônica ao diagnóstico ($p=0,04$), expressão de PIGF e metástase metacrônica ao diagnóstico ($p=0,009$), expressão de NOTCH1 na membrana e metástase metacrônica ao diagnóstico ($p=0,007$), expressão de NOTCH1 na membrana com ausência de metástase hepática (versus metástase em outros sítios) ($p=0,05$), expressão de NOTCH1 na membrana com metástase linfonodal ($p=0,007$), expressão de VEGFR1 na membrana e metástase pulmonar ($p=0,009$), expressão de VEGFR3 na membrana e metástase pulmonar ($p=0,05$), expressão de PIGF com ECOG 1 a 4 (versus ECOG 0) ($p=0,02$), expressão de NOTCH1 no citoplasma com *KRAS* mutado ($p=0,01$) e hiperexpressão de PI3K com ausência de metástase em peritônio ($p=0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Associação entre marcadores e características clínicas e patológicas entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha.

Marcador	Expressão	Característica	p
VEGFR1 membrana	<input type="checkbox"/>	- Metástase em pulmão	0,009
	<input type="checkbox"/>	- Metástase metacrônica	0,04
VEGFR3 membrana	<input type="checkbox"/>	- Metástase sincrônica (versus metacrônica)	0,03
	<input type="checkbox"/>	- Grau 3	0,02
PIGF	<input type="checkbox"/>	- Metástase metacrônica (versus sincrônica)	0,009
	<input type="checkbox"/>	- ECOG 1 a 4 (versus ECOG 0)	0,02
NOTCH1 citoplasma	<input type="checkbox"/>	- <i>KRAS</i> mutado	0,01
NOTCH1 membrana	<input type="checkbox"/>	- Metástase metacrônica	0,007
	<input type="checkbox"/>	- Ausência de metástase hepática	0,05
	<input type="checkbox"/>	- Metástase linfonodal	0,007
PI3K	<input type="checkbox"/>	- Ausência de metástase em peritônio	0,05

- **Marcadores Imuno-Histoquímicos e Resposta Objetiva**

Para avaliação de marcadores com resposta foi utilizada a população de 65 pacientes, aqueles com doença detectável pré-bevacizumabe, como citado previamente.

Não houve associação entre nenhum dos marcadores estudados e resposta objetiva.

- **Associação entre SLP e Marcadores Imuno-Histoquímicos**

Não houve associação entre nenhum dos marcadores estudados e SLP.

- **Associação entre SG e Marcadores Imuno-Histoquímicos**

Houve associação significativa entre maior SG e baixa expressão (<mediana) de PIGF ($p=0,04$), baixa expressão (<mediana) de NOTCH1 na membrana ($p=0,03$) e expressão (marcação moderada ou forte) de PI3K, $p=0,04$ (Figura 34).

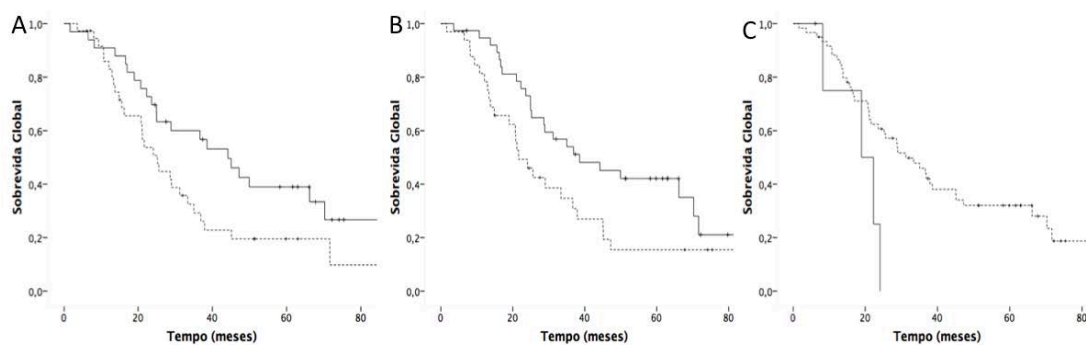


Figura 34 - Sobrevida global (SG) conforme expressão de marcadores entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - PIGF: < mediana (___) x > mediana (_ _ _); $p=0,04$. **B** - NOTCH1: < mediana (___) x > mediana (_ _ _); $p=0,03$. **C** - PI3K: Negativo ou fraco (___) x moderado ou forte (_ _ _). (escore 0: negativo; escore 1 a 3: fraco; escore 4 a 8: moderado e escore 9 a 12: forte). $p=0,04$.

- **Análise de eficácia no subgrupo VEGFR2 +/- NOTCH1+**

Devido os resultados encontrados individualmente com VEGFR2 e NOTCH1, realizamos análise combinada com resultados de ambos.

Não houve diferença significativa em TR, SLP e SG entre a comparação VEGFR2 (membrana ou citoplasma) positivo e NOTCH1 negativo versus VEGFR2 (membrana ou citoplasma) negativo e NOTCH1 positivo, apesar de ter havido uma tendência a melhor SG a favor do VEGFR2 membrana positivo e NOTCH1 negativo (Figura 35).

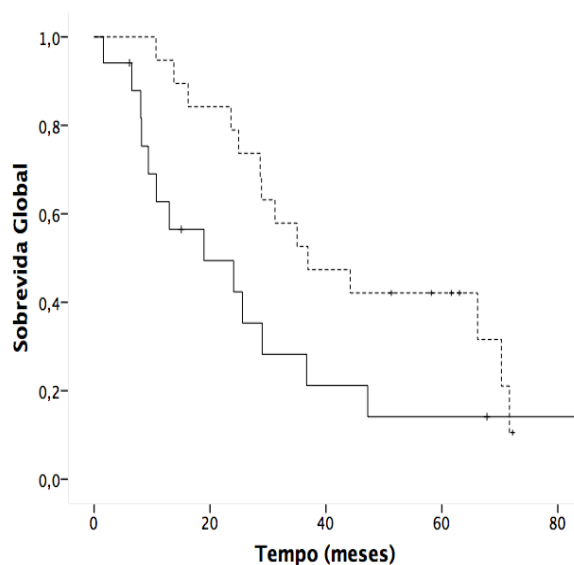


Figura 35 - Sobrevida global (SG) conforme expressão de VEGFR2 na membrana e NOTCH1. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. VEGFR2 membrana negativo e NOTCH1 positivo (___) x VEGFR2 membrana positivo e NOTCH1 negativo (_ _ _). $p=0,07$.

- **Associação entre os marcadores Imuno-Histoquímicos**

Segue abaixo tabela com associação dos marcadores entre si (**Quadro 10**).

Quadro 10 - Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos entre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha. Foi utilizado o teste do qui quadrado. Se > 20% das caselas tinham valores esperados abaixo de 5 ou valor esperado < 1 foi utilizado o teste exato de Fisher.

	VGFR1 Memb	VEGFR1 Citop	VGFR2 Memb	VEGFR2 Citop	VGFR3 Memb	VEGFR3 Citop	PIGF	DLL4	NOTCH1 Memb	NOTCH1 Citop	Integrina $\alpha_2\beta_1$	Integrina $\alpha_v\beta_3$	ILK	Fosfo- FAK	PI3K
VGFR1 Memb	-	<0.001	0.003	0.004	<0.001	<0.001	0.001	NS	NS	0.01	NS	NS	NS	0.05	NS
VEGFR1 citop	<0.001	-	<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001	0,04	NS	<0.001	0.01	<0.001	0.03	0.004	0.01
VGFR2 Memb	0.003	<0.001	-	<0.001	0.006	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.02
VEGFR2 Citop	0.004	<0.001	<0.001	-	0.002	0.002	NS	NS	NS	0.01	NS	NS	NS	NS	0.02
VGFR3 Memb	<0.001	0.001	0.006	0.002	-	<0.001	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VEGFR3 Citop	<0.001	0.001	NS	0.002	<0.001	-	0.03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PIGF	0.001	<0.001	NS	NS	0.03	0.03	-	NS	NS	0.002	NS	NS	0.03	0.02	NS
DLL4	NS	0,04	NS	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
NOTCH1 Memb	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS
NOTCH1 Citop	0.01	<0.001	NS	0.01	NS	NS	0.002	NS	NS	-	0.002	0.008	0.03	0.01	0.01
Integrina $\alpha_2\beta_1$	NS	0.01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.002	-	<0.001	0.004	<0.001	<0.001
Integrina $\alpha_v\beta_3$	NS	<0.001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.008	<0.001	-	<0.001	<0.001	<0.001
ILK	NS	0.03	NS	NS	NS	NS	0.03	NS	NS	0.03	0.004	<0.001	-	0.001	0.001
Fosfo-FAK	0.05	0.004	NS	NS	NS	NS	0.02	NS	NS	0.01	<0.001	<0.001	0.001	-	<0.001
PI3K	NS	0.01	0.02	0.02	NS	NS	NS	NS	NS	0.01	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	-

5.2 GRUPO DE VALIDAÇÃO

5.2.1 Características Clínicas e Demográficas

Foram incluídos nas análises, ao final da etapa de seleção, 31 pacientes (Figura 36). O tempo de seguimento mediano foi de 35,1 meses. O sexo masculino correspondeu a 52% dos pacientes. A idade mediana foi de 52 anos (32-73), e 46% apresentava alguma comorbidade.

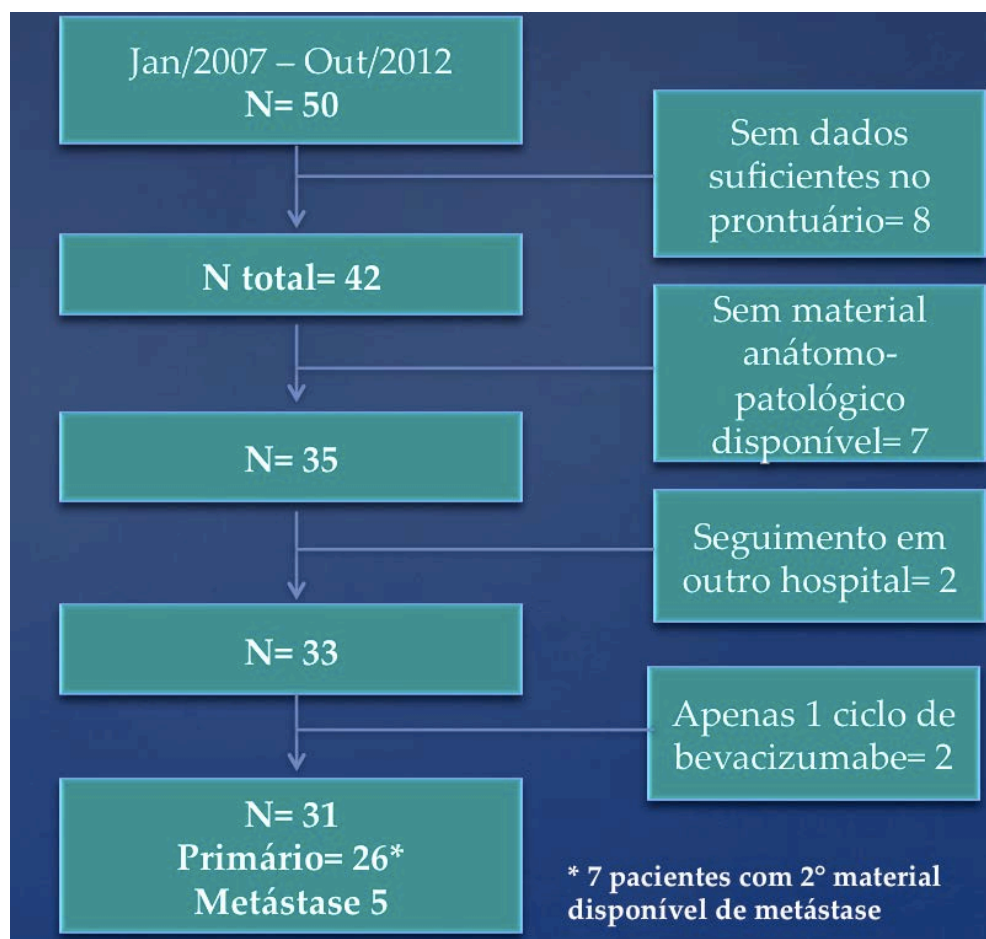


Figura 36 - Fluxograma com a seleção dos pacientes no grupo de validação. Pacientes metastáticos que receberam bevacizumabe (N=31). Origem do material anátomo-patológico para análise: Primário N=26, Metástase N=5.

A topografia do tumor primário foi intestino grosso esquerdo (distal à flexura esplênica) em 83% dos casos e intestino grosso direito (proximal à flexura esplênica) em 17% dos casos. A maioria dos tumores primários tinha grau histológico 2 (88%).

Setenta e nove por cento dos pacientes tinham tumores já metastáticos ao diagnóstico (metástase sincrônica). Ao início do bevacizumabe, metástase hepática esteve presente em 61% dos 31 pacientes, pulmonar em 45% e peritoneal em 35%, apesar disso 97% apresentavam ECOG 0 ou 1 ao início do bevacizumabe.

Em relação ao tratamento, 71% dos pacientes receberam o bevacizumabe em 1ª linha, enquanto 23% o fizeram em 2ª linha. FOLFIRI foi o esquema de quimioterapia mais frequentemente empregado (55%), seguido por FOLFOX (45%). Ressecção de metástase foi realizada em algum ponto do tratamento em 39% dos pacientes.

Todos os dados supracitados estão sumarizados na Tabela 15 abaixo.

Tabela 15 - Características clínicas, demográficas e de tratamento dos pacientes do grupo de validação.

Variável (N= número de pacientes com informação)	
Idade em anos	
Mediana	52 (32-73)
Sexo (N= 31)	
Masculino	52%
Feminino	48%
Comorbidades (N= 28)	
Sim	46%
Não	54%
Localização (N= 29)	
Intestino grosso esquerdo	83%
Descendente / sigmóide / reto alto	59%
Reto médio – baixo	24%
Intestino grosso direito	17%
Ascendente	17%
Transverso	0%
Histologia (N= 31)	
Adenocarcinoma não especificado	61%
Adenocarcinoma tubular	26%
Adenocarcinoma mucinoso	10%
Adenocarcinoma cribriforme	3%
Grau (N= 25)	
1	0%
2	88%
3	12%
Tamanho (N= 26)	
T1	0%
T2	8%
T3	69%
T4	8%
Tx	15%
Status linfonodal (N= 26)	
N0	19%
N1	31%
N2	31%
Nx	19%
Estádio ao diagnóstico (N=29)	
I	7%
II	0%
III	14%
IV	79%
Sítios de metástases ao início do bevacizumabe (N= 31)	
Fígado	61%
Pulmão	45%
Peritônio	35%
Linfonodo	29%
Recidiva loco-regional	6.5%

Cont/ Tabela 15

Variável (N= número de pacientes com informação)	
Ressecção de metástases durante todo histórico do paciente (N= 31/31)	39%
Linha do bevacizumabe (N= 31)	
1 ^a	71%
2 ^a	23%
3 ^a	3%
4 ^a	3%
ECOG pré-bevacizumabe (N= 29)	
0	52%
1	45%
2	3%
Presença de doença detectável antes do início do bevacizumabe (N= 31)	100%
Quimioterapia associada ao bevacizumabe (N= 31)	
FOLFIRI	55%
FOLFOX	45%
Ciclos de quimioterapia	
Mediana	12 (2 - 47)
Ciclos de bevacizumabe	
Mediana	9 (2 - 71)
Dose do bevacizumabe 5mg/Kg D1 e D15 (N= 31)	100%
Uso do bevacizumabe além da progressão, sem interrupção (N= 31)	29%
HAS (N= 25)	
0	60%
1	4%
2	20%
3	16%
4	0%

5.2.2 Desfechos Clínicos

- **Variáveis Clínicas e Correlação com Taxa de Resposta**

As variáveis sexo, ECOG (0 versus 1 a 4) e a linha na qual o bevacizumabe foi utilizado estiveram associadas com resposta objetiva (Tabela 16).

Tabela 16 - Associação da Resposta Objetiva com as Variáveis Clínicas

Variável	categoria	Resposta Objetiva		Total	p
		RC+RP	DE+PD		
Sexo	Masculino	9 (64)	5 (36)	14	0,04
	Feminino	4 (27)	11 (73)	15	
Grau	2	10 (45)	12 (55)	22	0,49
	3	0 (0)	2 (100)	2	
Histologia produtor de mucina	não	13 (50)	13 (50)	26	0,23
	sim	0 (0)	3 (100)	3	
Metástase hepática	não	4 (36)	7 (64)	11	0,70
	sim	9 (50)	9 (50)	18	
Metástase pulmonar	não	10 (59)	7 (41)	17	0,07
	sim	3 (25)	9 (75)	12	
ECOG	0	10 (67)	5 (33)	15	0,02
	1 a 4	3 (23)	10 (77)	13	
HAS	não	9 (60)	6 (40)	15	0,22
	sim	3 (30)	7 (70)	10	
Linha do uso do bevacizumabe	1	12 (57)	9 (43)	21	0,05
	2	1 (14)	6 (86)	7	
	3	0 (0)	1 (100)	1	

*porcentagem relativa às linhas

- **Desfechos Clínicos e Correlação com Sobrevida Livre de Progressão**

A SLP mediana da população global (N=31 pacientes) foi de 7,9 meses (Figura 37).

Houve associação significativa entre maior SLP e ECOG 0 (versus 1 a 4) (p=0,01); grau histológico 2 (versus grau 3) (p=0,003), ausência de metástase hepática (metástase em outros sítios versus presença de metástase hepática) (p=0,05) e uso de bevacizumabe em 1º linha versus demais linhas (p=0,04) (Figura 38).

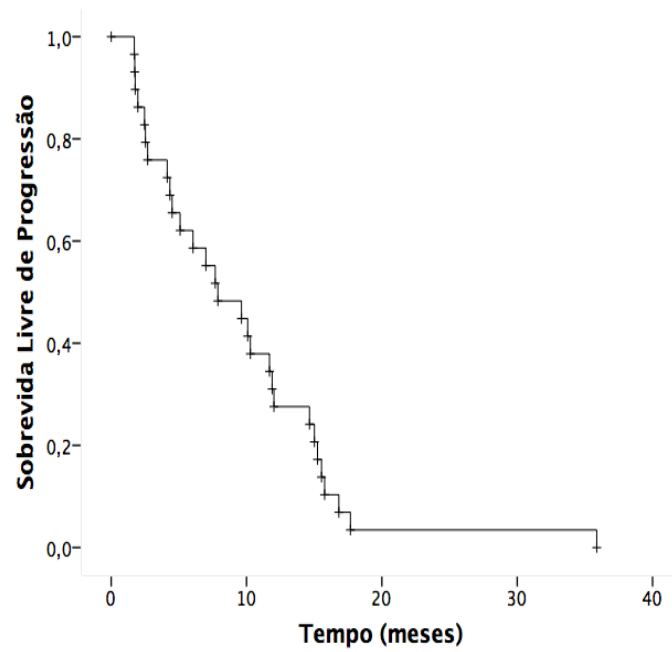


Figura 37 - Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) da amostra de pacientes do grupo de validação (N=31 pacientes). A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. Sobrevida mediana foi de 7,9 meses.

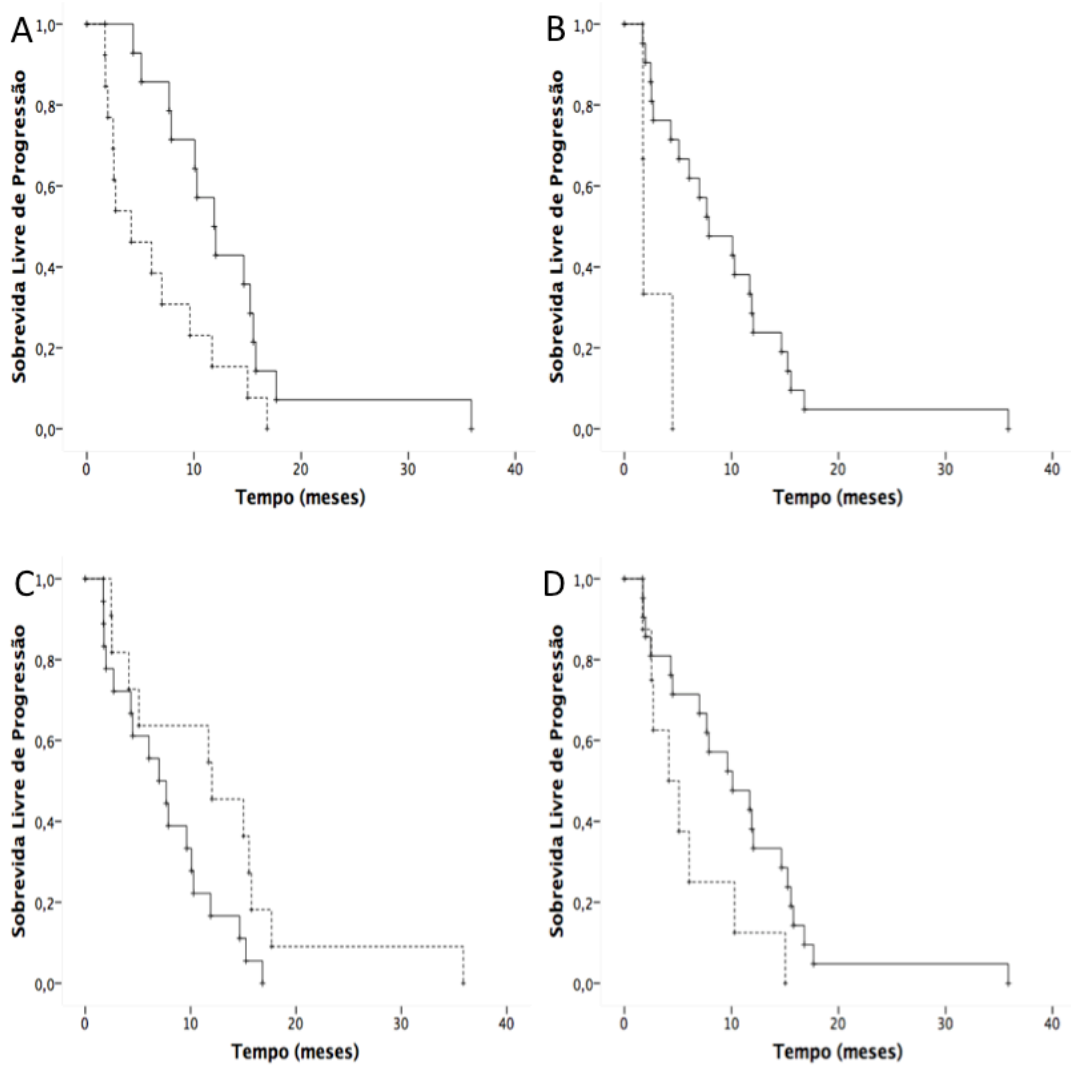


Figura 38 - Curva de sobrevida livre de progressão (SLP) conforme características clínicas dos pacientes do grupo de validação. As curvas foram calculada pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - ECOG 0 (___) versus 1 a 4 (___). $p=0,01$. **B** - Grau histológico: Moderadamente diferenciado= Grau 2 (___) x Pouco diferenciado= Grau 3 (___); $p=0,003$. **C** - Ausência de metástase hepática, com metástase em outros sítios (___) versus presença de metástase hepática (___): Sim x Não; $p=0,05$. **D** - Uso de bevacizumabe em 1° linha (___) versus uso em demais linhas (___). Sim x não; $p=0,04$.

- **Variáveis Clínicas e Correlação com Sobrevida Global (SG)**

A SG mediana da população global (N=31 pacientes) foi de 36,9 meses (Figura 39).

Houve associação significativa entre maior SG e ECOG 0 (versus 1 a 4) ($p=0,009$) e ressecção de metástase ($p=0,008$) (Figura 40).

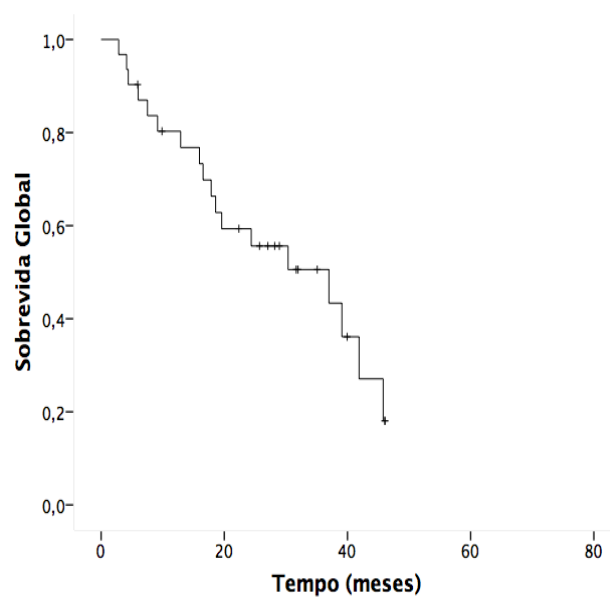


Figura 39 - Sobrevida global (SG) da amostra de pacientes do grupo de validação (N=31 pacientes). A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. Sobrevida mediana foi de 36,9 meses

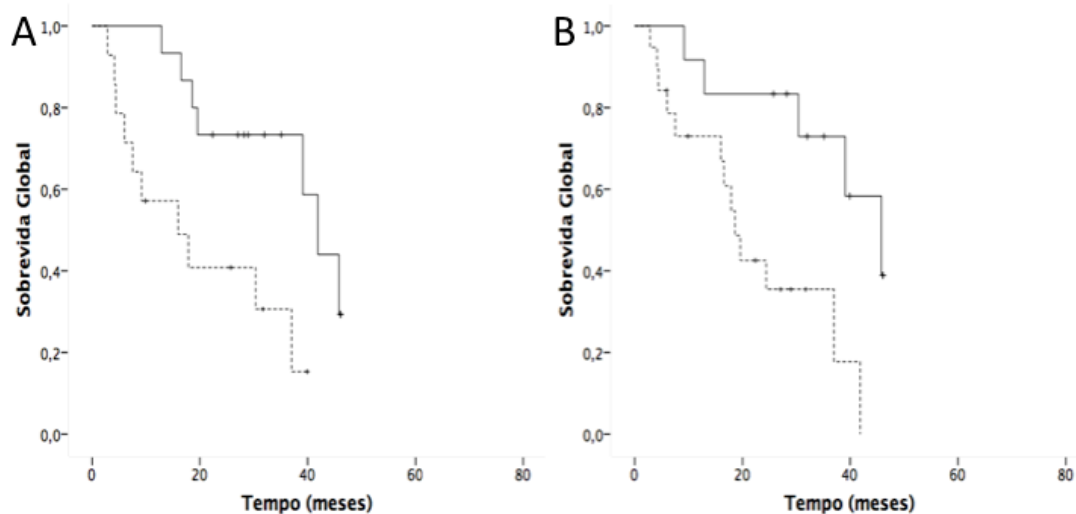


Figura 40 - Sobrevida global (SG) conforme características clínicas dos pacientes do grupo de validação. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - ECOG: 0 (___) x 1 a 4 (_ _ _); $p=0,009$. **B** - Ressecção de metástases: Sim (___) x não (_ _ _); $p=0,008$.

5.2.3 Análise da Influência da Expressão de Marcadores Imuno-Histoquímicos

A expressão dos marcadores integrina $\alpha_2\beta_1$, ILK, FAK e PI3K foi avaliada nessa coorte de 31 pacientes. Devido os resultados encontrados na população com 102 pacientes, realizamos a avaliação de VEGFR2 e NOTCH1 nessa população com 31 pacientes (além dos demais que já foram realizados, citados acima) com leitura no Aperio, como foi realizada na coorte de 102 pacientes. Reação com integrina $\alpha_v\beta_3$ não foi realizada por falta do anticorpo.

A Associação entre os marcadores Imuno-Histoquímicos e características anátomo-clínicas.

Houve associação de metástase pulmonar com menor expressão de NOTCH1 membrana ($p=0,008$).

Não houve associação entre a expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$, ILK, FAK, PI3K, VEGFR2 membrana, nem VEGFR2 citoplasma com características clínicas ou histopatológicas.

B Marcadores Imuno-Histoquímicos e Resposta Objetiva

Não houve associação entre nenhum dos marcadores estudados e resposta objetiva (Tabela 17).

Tabela 17 - Associação da resposta objetiva com os marcadores imuno-histoquímicos entre os pacientes do grupo de validação.

Variável	Categoria	Resposta Objetiva		Total	p
		RC+RP	DE+PD		
Integrina $\alpha_2\beta_1$	fraco a negativo	12 (48)	13 (52)	25	0,60
	moderado a forte	1 (25)	3 (75)	4	
ILK	fraco a negativo	11 (50)	11 (50)	22	0,41
	moderado a forte	2 (29)	5 (71)	7	
Fosfo-FAK	fraco a negativo	11 (41)	16 (59)	27	0,19
	moderado a forte	2 (100)	0 (0)	2	
PI3K p85	negativo ou fraco	8 (40)	12 (60)	20	0,69
	moderado ou forte	5 (55)	4 (45)	9	
NOTCH1 membrana	< mediana	3 (27)	8 (73)	11	0,39
	> mediana	6 (55)	5 (45)	11	
VEGFR2 membrana	< mediana	10 (48)	11 (52)	21	1,0
	> mediana	2 (40)	3 (60)	5	
VEGFR2 citoplasma	< mediana	9 (41)	13 (59)	22	0,31
	> mediana	3 (75)	1 (25)	4	

*porcentagem relativa às linhas

C Associação entre SLP e Marcadores Imuno-Histoquímicos

Houve associação entre maior SLP com baixa expressão (marcação negativa ou fraca) de integrina $\alpha_2\beta_1$, $p=0,03$ e com expressão de VEGFR2 membrana, $p=0,05$ (Figura 41).

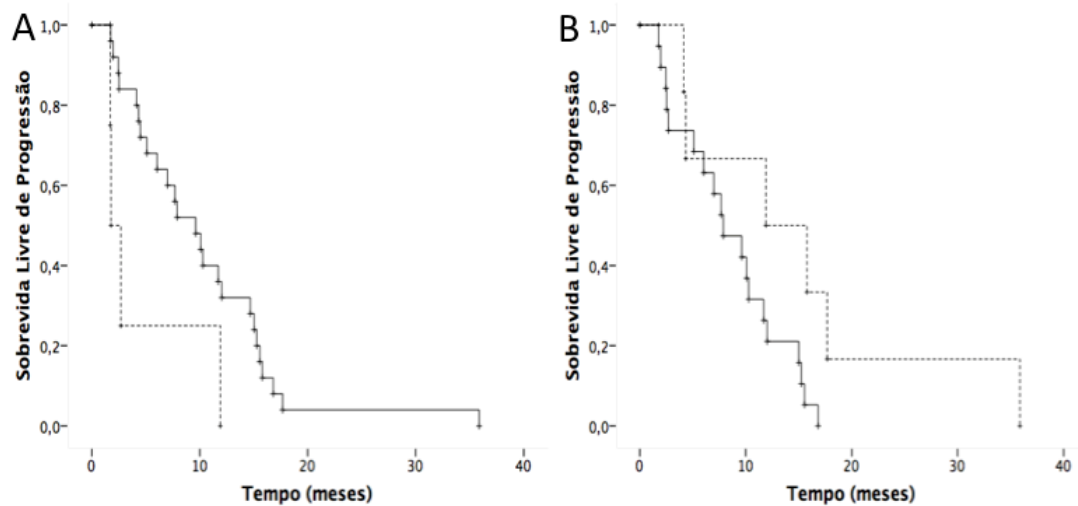


Figura 41 - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme expressão dos marcadores entre os pacientes do grupo de validação. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. **A** - Integrina $\alpha_2\beta_1$: negativo ou fraco (___) x moderado ou forte (_ _ _); $p=0.03$. **B** - VEGFR2 membrana < mediana (_ _ _) x > mediana (___); $p=0.05$

D Associação entre SG e Marcadores Imuno-Histoquímicos

Não houve associação significativa entre a expressão dos marcadores avaliados e diferença em SG.

E Associação entre os marcadores Imuno-histoquímicos

Segue abaixo o quadro com associação dos marcadores entre si (Quadro 11).

Quadro 11- Associação entre os marcadores na amostra de pacientes do grupo de validação.

	Integrina $\alpha_2\beta_1$	ILK	FAK	PI3K	VEGFR2 membrana	VEGFR2 citoplasma	NOTCH1 membrana
Integrina $\alpha_2\beta_1$	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ILK	NS	-	NS	0.02	NS	NS	NS
fosfo-FAK	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS
PI3K	NS	0.02	NS	-	NS	NS	NS
VEGFR2 membrana	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS
VEGFR2 citoplasma	NS	NS	NS	NS	NS	-	NS
NOTCH1 membrana	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-

5.3 RESUMO DOS RESULTADOS

Segue resumo dos resultados da correlação da TR, SLP e SG com os dados clínicos e de marcadores no grupo casos (Quadro 12) e comparação dos resultados da correlação da SLP e SG com a expressão dos marcadores entre grupo casos, subgrupo casos tratados em primeira linha e grupo de validação (Quadro 13).

Quadro 12 - Resumo dos resultados no grupo casos.

	Clínico	Imunohistoquímica
↑TR	-Histologia não produtora de mucina -Grau 1 e 2 (versus 3) -Tumor primário localizado à esquerda* -Presença de metástase hepática*	-
↑SLP	-ECOG 0 ou 1 (versus 2 ou 3) -Tumor primário localizado à esquerda* -Ter sido submetido a cirurgia do tumor primário -Ausência de metástase em linfonodo	↑ VEGFR2 cito ↑ Integrina $\alpha_v\beta_3$ ↑ ILK ↑ PI3K
↑SG	-ECOG 0 ou 1 (versus 2 ou 3) -Ter sido submetido a cirurgia do tumor primário -Ausência de metástase em linfonodo -Presença de metástase hepática -Metástase sincrônica -Ressecção de metástase* - Grau 1 e 2 (versus 3) * -KRAS selvagem	↓ NOTCH1 ↑ Integrina $\alpha_2\beta_1$ ↑ PI3K

* Resultados associados de forma independente

Quadro 13 - Comparação dos resultados da correlação da SLP e SG com os marcadores entre grupo casos, subgrupo casos tratados em primeira linha e grupo de validação.

	↑ SLP	↑ SG
Grupo casos	↑ VEGFR2 citoplasma ↑ Integrina $\alpha_v\beta_3$ ↑ ILK ↑ PI3K	↓ NOTCH1 membrana ↑ Integrina $\alpha_2\beta_1$ ↑ PI3K
Primeira linha		↓ PIGF ↓ NOTCH1 membrana ↑ PI3K
Grupo de validação	↑ VEGFR2 membrana ↓ Integrina $\alpha_2\beta_1$	

6 DISCUSSÃO

Estudos fase III demonstraram o benefício de se associar bevacizumabe à quimioterapia em primeira ou segunda linha de tratamento em pacientes com câncer colorretal metastático (GIANTONIO et al. 2007; SALTZ et al. 2008). Entretanto, como esse benefício não é homogêneo, associado aos efeitos colaterais e custo do bevacizumabe, é de suma importância que se encontre um biomarcador de eficácia capaz de selecionar os pacientes que de fato irão se beneficiar do medicamento e poupar da toxicidade aqueles que não irão se beneficiar, reduzindo assim também os custos do tratamento. Devido à complexidade do processo de angiogênese e dos resultados heterogêneos da pesquisa nesse campo, é pouco provável que apenas um biomarcador seja suficiente para selecionar os pacientes que deverão ser tratados com bevacizumabe. Atualmente, não há nenhum biomarcador para selecionar o uso do bevacizumabe aprovado para uso na prática clínica.

Nós realizamos um estudo retrospectivo em uma coorte de pacientes com câncer colorretal metastático tratados com quimioterapia baseada em 5-FU infusional associado à oxaliplatina, ou irinotecano, e bevacizumabe. O objetivo foi avaliar a eficácia desse tratamento e tentar associá-lo com características clínicas e com a expressão por imuno-histoquímica de proteínas envolvidas na angiogênese.

Em relação a associação da expressão dos marcadores com características clínicas, presença de metástase pulmonar foi associada com expressão de VEGFR1 e VEGFR3.

VEGFR1 está associado com a formação do nicho pré-metastático na metástase pulmonar, modulando o acúmulo de células derivadas da medula óssea nestes sítios, apesar de existir também um mecanismo que não depende de VEGFR1 (DUDA e JAIN 2010). Em geral, a associação com VEGFR3 é mais obscura, já que esta proteína está associada ao processo de metástase linfangiogênica e para linfonodo (SHIBUYA et al. 2011), e não à disseminação hematogênica.

A expressão de ILK foi associada à presença de metástase peritoneal. Não foi encontrado relato prévio sobre essa associação.

Nossos resultados de eficácia, como TRO de 51%, SLP de 9,8 meses e SG de 24,9 meses em toda população do estudo, e TRO de 58%, SLP de 10,7 meses e SG de 29 meses no subgrupo de pacientes tratados em primeira linha foram compatíveis com os estudos existentes na literatura (HURWITZ et al. 2004; SALTZ et al. 2008; BENDELL et al. 2012; HEINEMANN et al. 2014; VENOOK et al. 2014), de forma que podemos afirmar que esta é uma população que representa bem os pacientes incluídos nos estudos controlados que testaram a associação de quimioterapia com bevacizumabe.

Tumores oriundos do cólon esquerdo e reto apresentam alterações genéticas diferentes daquelas presentes em tumores do cólon direito (Cancer Genome Atlas Network 2012). O VEGFA foi demonstrado ser expresso mais frequentemente em tumores do cólon esquerdo e reto do que naqueles do cólon direito (BENDARDAF et al. 2008). BOISEN et al. (2013) observaram maior sobrevida nos pacientes com câncer colorretal do sigmóide e reto em relação àqueles com tumores de cólon direito em pacientes tratados com quimioterapia e bevacizumabe, mas não naqueles tratados apenas com quimioterapia, levantando a hipótese de que bevacizumabe teria eficácia

restrita aos pacientes com tumores do sigmóide e reto. Nesse mesmo estudo, 25-30% dos pacientes apresentavam tumor primário no ceco/cólon ascendente e transversal, e 70-75% posteriores à flexura esplênica. Em nosso estudo, onde 100% dos pacientes receberam bevacizumabe, 80% dos tumores primários foram localizados após a flexura esplênica (cólon descendente, sigmóide e reto), e observamos maior taxa de resposta e maior SLP nestes em comparação com tumores primários situados no cólon direito. LOUPAKIS et al. (2015) avaliaram retrospectivamente o lado do tumor primário em relação à flexura esplênica como fator prognóstico ou preditivo em relação ao uso do bevacizumabe a partir dos dados de 3 estudos prospectivos. Os autores concluíram que o bevacizumabe apresenta eficácia independente do lado do tumor primário e que tumores do lado direito têm pior prognóstico independentemente da histologia mucinosa.

Em nosso estudo a expressão de NOTCH1 citoplasmático foi associada a tumores de cólon direito. CHU et al. (2011), no entanto, demonstraram não haver diferença na expressão do NOTCH1 em relação a localização do tumor primário.

Não houve associação da localização com outros marcadores. Não há diferença também entre o lado direito e esquerdo do cólon em relação à expressão de VEGFR1, VEGFR2 (LOUPAKIS et al. 2015), integrina β_1 , integrina β_3 , FAK (SUN et al. 2014), e PI3K p85 (JOHNSON et al. 2010). Não foi encontrada informação para expressão de PIGF, DLL4 e ILK em relação o sítio do tumor no cólon.

O grau histológico é um importante fator prognóstico em pacientes com câncer colorretal. LIU et al. (2011) demonstraram que tumores com alto grau têm pior prognóstico, também na doença metastática. Na nossa população, 87% dos pacientes apresentaram tumores com grau histológico 1 ou 2 e 13%, grau histológico

3. Grau histológico 1 ou 2 (versus 3) esteve associado a maior TRO, além de estar associado como fator independente à SG na análise multivariada. No subgrupo tratado em primeira linha, o grau histológico 1 ou 2 esteve associado à maior SLP e SG.

Na nossa coorte, 5% dos pacientes apresentaram adenocarcinoma mucossecretor e 4% adenocarcinoma mucinoso. Essas histologias estiveram associadas a menor taxa de resposta. Carcinoma mucinoso representa 11 a 17% do total dos cânceres colorretais. Em geral, caracterizam-se pela localização preferencial no lado direito do cólon e por apresentar baixa resposta à quimioterapia, apesar de haver controvérsia, uma vez que a instabilidade de microssatélites pode influenciar o prognóstico desses tumores (GRYFE et al. 2000). Apenas estudos pequenos avaliaram o impacto prognóstico da histologia mucinosa após estratificação entre tumores com instabilidade e estabilidade de microssatélites. Como exemplo, foi demonstrado que pacientes portadores de tumores com estabilidade de microssatélites não apresentam diferença no prognóstico entre histologia mucinosa ou não-mucinoso. Da mesma forma, uma análise de tumores proximais, demonstrou não haver diferença no prognóstico entre tumores mucinosos ou não-mucinosos (KIM et al. 2013). No nosso estudo a expressão de ILK e PI3K esteve associada à histologia não produtora de mucina. Não foram encontrados relatos sobre a associação.

Nos Estados Unidos, entre os pacientes que recebem diagnóstico de câncer colorretal, 20% são metastáticos ao diagnóstico (EC IV ao diagnóstico) (SIEGEL et al. 2015). Porém, entre os pacientes metastáticos, em geral 65-70% apresentam metástases sincrônicas, enquanto 30-35% são metacrônicas (SALTZ et al. 2008;

BENDELL et al. 2012; BOISEN et al. 2013). Em nossa casuística, onde 100% dos pacientes eram metastáticos no momento do início do bevacizumabe, 73% apresentaram metástase sincrônica, sendo que estes apresentaram melhor SG, em relação aos pacientes com metástase metacrônica. No subgrupo de pacientes tratados em primeira linha, houve maior TR e SG entre os pacientes com metástase sincrônica. Uma possível explicação, seria que na presença do tumor primário, o parênquima hepático adjacente à metástase hepática sincrônica oferece um ambiente favorável à angiogênese e consequente crescimento tumoral, uma vez que metástases sincrônicas ressecadas ainda com tumor primário presente apresentam maior expressão de proteínas pró-angiogênicas no tecido adjacente à metástase, em comparação com metástases sincrônicas com tumores primários ressecados e com metástases metacrônicas com ressecção prévia do tumor primário (VAN DER WAL et al. 2012). Esses dados foram corroborados pelo estudo CAIRO 3 (manutenção com capecitabina e bevacizumabe versus observação, após indução com quimioterapia e bevacizumabe), onde o maior benefício da manutenção com capecitabina e bevacizumabe foi observado no subgrupo de pacientes com metástase sincrônica e tumor primário ressecado (em comparação com pacientes com metástase metacrônica) (KOOPMAN et al. 2014). No nosso estudo, metástase sincrônica foi associada a expressão baixa de VEGFR1 no citoplasma, VEGFR3 na membrana e PlGF. Como citado previamente, estudo realizado por VAN DER WAL et al. (2012) indica que pacientes com metástases hepáticas sincrônicas ressecadas apresentam mais fatores pró-angiogênicos no parênquima adjacente a metástase do que nos casos também com metástase sincrônica, mas que a metástase foi ressecada 3 a 12 meses após a ressecção do tumor primário metástase ou nos casos de metástase metacrônica

onde a ressecção da metástase hepática foi realizada após 14 meses da ressecção do tumor primário. Dessa forma, esse estudo sugere que em pacientes com câncer colorretal com metástase hepática, a presença do tumor primário (ou seja, casos de metástases sincrônicas) pode propiciar um ambiente angiogênico próspero para o crescimento tumoral metastático no fígado. Uma possível explicação para os achados em nosso estudo é que expressão baixa de VEGFR1, VEGFR3 e PlGF pode significar maior importância funcional do VEGFA e um estado pró-angiogênico. Entretanto, bastante cuidado com a conclusão dessa análise é necessário, uma vez que alguns fatores podem ter influenciado os resultados citados acima de expressão dos marcadores angiogênicos e relação com apresentação sincrônica ou metacrônica da metástase, como momento da ressecção da metástase sincrônica em relação ao momento da ressecção do tumor primário, sítio da metástase, sítio do tumor primário, pesquisa do marcador no sítio primário versus metastático (a expressão dos marcadores foi associada com a apresentação clínica sincrônica ou metacrônica da metástase, mas não necessariamente a expressão foi avaliada no sítio primário ou metastático) e uso de quimioterapia ou terapia-alvo antes da ressecção.

ADAM et al. (2001 e 2004) e KOPETZ et al. (2009) demonstraram aumento significativo de sobrevida nos pacientes submetidos à ressecção de metástase hepática. Em nosso estudo, a ressecção de metástase, realizada em 58% dos pacientes (38% do total dos pacientes foram submetidos à ressecção de metástase hepática), foi associada a maior SG, sendo o fator com maior impacto na SG na análise multivariada.

Em estudos fase 3, quando o bevacizumabe foi associado ao IFL (irinotecano, 5-fluorouracil e ácido folínico) em primeira linha de tratamento, houve aumento de

TRO, SLP e SG (HURWITZ et al. 2004). Quando associado à oxaliplatina em primeira linha de tratamento, o bevacizumabe promoveu aumento da SLP, porém não houve diferença em taxa de resposta, nem em SG (SALTZ et al. 2008). Quando o bevacizumabe foi associado a FOLFOX (5-fluorouracil infusional, ácido folínico e oxaliplatina) em segunda linha de tratamento, houve aumento da TRO, SLP e SG (GIANTONIO et al. 2007). No BRiTE (KOZLOFF et al. 2009), um estudo observacional prospectivo, os pacientes receberam bevacizumabe em primeira linha associado ao FOLFOX ou ao FOLFIRI (5-fluorouracil infusional, ácido folínico e irinotecano) na maioria dos casos. A SLP e a SG foi similar quando o bevacizumabe foi associado a FOLFOX ou a FOLFIRI. De forma similar, também não observamos no nosso estudo, diferença de eficácia quando o bevacizumabe foi associado a FOLFOX em comparação a associação com FOLFIRI, tanto na população inteira, como no subgrupo tratado em primeira linha.

No nosso estudo, 33% dos pacientes desenvolveram hipertensão arterial sistêmica (HAS). Em relação ao desenvolvimento de HAS durante o tratamento como biomarcador clínico para eficácia do bevacizumabe, os resultados dos estudos em pacientes com câncer colorretal são divergentes. Para minimizar esse fato, CAI et al. (2013) realizaram uma metanálise onde concluíram que o desenvolvimento de HAS está associado a maior TRO, SLP e SG. No presente estudo, o subgrupo de pacientes tratados em primeira linha que desenvolveram HAS apresentaram maior SLP, o que foi de acordo com a metanálise citada. Um fato interessante foi a associação entre a expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ com HAS no grupo casos (mas não no subgrupo tratado em primeira linha), onde integrina $\alpha_v\beta_3$ foi associada com maior SLP. Houve ainda uma tendência de associação entre expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$ e

HAS ($p=0,06$). De fato, a fosforilação de FAK na presença das integrinas β_3 e β_1 nos vasos sanguíneos de camundongos está associada à HAS (HEERKENS et al. 2014).

Em relação aos resultados presentes na literatura de marcadores pesquisados por imuno-histoquímica, método utilizado em nosso estudo, BRUHN et al. (2014) correlacionaram a expressão de IL6, IL8, bFGF, PDGF e VEGFA em amostras tumorais de pacientes do estudo fase III MAX (capecitabina vs. capecitabina e bevacizumabe vs. capecitabina, bevacizumabe e mitomicina). Pacientes cujos tumores tiveram expressão de VEGFA abaixo da mediana apresentaram maior TR e SLP nos braços com que receberam bevacizumabe. A expressão dos demais fatores angiogênicos citados não apresentou correlação com a eficácia do bevacizumabe. Ao contrário, WATANABE et al. (2011) demonstraram que os pacientes que responderam ao tratamento foram os que apresentaram maior expressão de VEGFA no tumor. Todavia, outros quatro estudos falharam em tentar demonstrar a associação da expressão de VEGFA no tumor com a eficácia do tratamento com bevacizumabe (JUBB et al. 2006; FOERNZLER et al. 2010; POHL et al. 2011; KARA et al. 2012). Em uma outra análise do estudo fase III MAX (WEICKHARDT et al. 2011), a baixa expressão de VEGFR1 no tumor esteve associada a maior SG. A análise de biomarcadores, avaliando a expressão no tumor, por imuno-histoquímica, realizada no estudo NO16966 (FOLFOX/XELOX com ou sem bevacizumabe em primeira linha) demonstrou que a expressão de VEGFR1 não estava associada à SLP ou à SG, enquanto pacientes com baixa expressão de neuropilina-1 apresentaram melhores desfechos com bevacizumabe (FOERNZLER et al. 2010). Da mesma forma, nosso estudo não encontrou associação entre a expressão de VEGFR1 no tumor e a eficácia do tratamento com bevacizumabe.

Por outro lado, a marcação citoplasmática para VEGFR2 esteve associada a maior SLP. Como VEGFR2 é ativado por VEGFA e constitui o receptor predominante na sinalização pró-angiogênica, associado ao fato de que o bevacizumabe inibe a ligação de VEGFA a VEGFR2, faz sentido biológico, e de fato seria mais provável, que tumores com maior expressão de VEGFR2 apresentassem maior dependência do VEGFA e conseqüente maior resposta ao tratamento contendo bevacizumabe. Em contrapartida, os estudos NO16966 e MAX não encontraram correlação entre a expressão de VEGFR2 por imuno-histoquímica nos tumores e desfechos em pacientes com câncer colorretal tratados com bevacizumabe (STRICKLER e HURWITZ 2012).

YILDIZ et al. (2010) avaliaram, retrospectivamente, a expressão de VEGFR3 no tumor por imuno-histoquímica em 42 pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia associada ao bevacizumabe. A expressão de VEGFR3 não esteve associada a TR, SLP ou SG. Em nosso estudo também não encontramos associação da expressão de VEGFR3 com os mesmos desfechos.

A expressão dos três receptores, VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3, esteve mutuamente correlacionada, o que é esperado devido à grande interação de suas vias, fatores ativadores e influência que cada receptor exerce no outro.

Nos pacientes tratados em primeira linha em nosso estudo, a expressão de PIGF foi associada a pior SG. Não há relato na literatura sobre expressão de PIGF por imuno-histoquímica e correlação com eficácia do tratamento com bevacizumabe em pacientes com câncer colorretal ou outros tumores. Contudo, seguindo o mesmo racional, a elevação dos níveis circulantes de PIGF no sangue esteve associada à progressão de doença em pacientes portadores de câncer colorretal sob tratamento

com bevacizumabe (LAMBRECHTS et al. 2013). SUNG et al. (2012), através de imuno-histoquímica, concluíram também que a expressão elevada de PlGF nas células tumorais está associada a estádios mais avançados e pior sobrevida em pacientes com câncer colorretal, não tratados com bevacizumabe. Houve associação de PlGF com a expressão de VEGFR1, VEGFR3, NOTCH1, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK e FAK. A associação com VEGFR1 é esperada já que o PlGF é o principal ligante daquele receptor e pode constituir um dos mecanismos de indução de angiogênese em estados patológicos. Esperávamos encontrar uma associação também com PI3K, pela influência que o par PlGF/VEGFR1 tem nesta via, porém esta não foi encontrada. NOTCH1 reduz a expressão de VEGFR2 e aumenta a de VEGFR1, influenciando a atividade de PlGF. VEGFR3 também pode, indiretamente modular a atividade de PlGF, uma vez que modifica a expressão de NOTCH1. Pode-se explicar a correlação com expressão de ILK e FAK pela associação que ocorreu entre PlGF e integrina $\alpha_2\beta_1$ e integrina $\alpha_v\beta_3$.

JUBB et al. (2009) avaliaram retrospectivamente a expressão no tumor primário de DLL4 em 177 casos câncer colorretal. Marcação citoplasmática no endotélio relacionado ao tumor foi observada em 71% dos casos, enquanto que praticamente não houve marcação nas células endoteliais do tecido normal. Os autores também encontraram expressão nas células tumorais, estando presente em 16% dos casos. A expressão de DLL4 não teve impacto prognóstico nesse estudo, mas DLL4 teve associação com a expressão de VEGFA, sugerindo possível papel na predição de resposta à terapia anti-VEGF. DLL4 tem papel na sustentação da morfologia dos vasos sanguíneos e sua inibição resulta na formação de vasos mal formados. Apesar disso, a inibição de Dll4-Notch suprime o crescimento tumoral

(BRZOZOWA et al. 2013). Ativação da via DLL4 tem sido associada à resistência ao tratamento anti-angiogênico (HU et al. 2011). JUBB et al. (2011), numa análise retrospectiva de biomarcadores do estudo fase III AVF2119g (capecitabina com ou sem bevacizumabe em pacientes com câncer de mama), encontraram que a expressão baixa de DLL4, por imuno-histoquímica em material parafinado, nas células endoteliais do tumor esteve associada a maior SLP. Os autores comentam que a expressão nas células tumorais foi rara, impossibilitando a correlação com os desfechos do tratamento. Não há na literatura correlação relatada entre a expressão de DLL4 e desfechos clínicos em pacientes com outros tumores, incluindo câncer colorretal, tratados com bevacizumabe. Em nosso estudo não houve associação entre a expressão de DLL4 pesquisado na membrana de células tumorais e TR, SLP ou SG. Não houve associação de DLL4 com nenhum dos outros marcadores pesquisados. Era esperada a associação de DLL4 pelo menos com NOTCH1 e VEGFR2.

A perda da proteína APC é frequente no câncer colorretal e resulta em excesso de β -catenina, componente da via WNT. β -catenina ativa NOTCH1 através da regulação da expressão de JAGGED1 (RODILLA et al. 2009). CHU et al. (2011) observaram, entre 1003 amostras de tumor colorretal localizado e submetido à cirurgia, que 52,1% dos casos foram positivos (considerados aqueles com intensidade fraca, moderada ou forte) para NOTCH1 (marcação em membrana e citoplasma de células tumorais). Em consonância com o racional pré-clínico, pacientes cujos tumores expressaram NOTCH1 tiveram pior sobrevida global (38 meses versus 66 meses para NOTCH1 negativo).

Uma vez que NOTCH1 tem papel em manter a vascularização organizada e funcional, tendo papel complementar ao par VEGFA/VEGFR2 na angiogênese, levanta-se a hipótese de que o aumento da expressão de NOTCH1 acarretaria uma possível resistência ao tratamento com terapias anti-VEGF, como o bevacizumabe, podendo servir como possível fator prognóstico ou preditor de resposta a esse tratamento. Por outro lado, a menor expressão de NOTCH1, resultaria em aumento da angiogênese não funcionante e conseqüente aumento da hipóxia e redução tumoral (YAN e PLOWMAN 2007). HERNANDEZ et al. (2013) mostraram, em modelos celulares e em camundongos, que a inibição de NOTCH1 reforça os efeitos anti-angiogênicos da inibição de VEGF. Dentro dessa linha de raciocínio e de acordo com os resultados de CHU et al. (2011) citados acima, nosso estudo também mostrou que a expressão de NOTCH1 nas células tumorais está associada a pior sobrevida, tanto na população inteira, como no subgrupo tratado em primeira linha, porém com a diferença de que nossa população foi toda composta por pacientes metastáticos e tratados com bevacizumabe. SAITO et al. (2015) também observaram que, em pacientes com glioblastoma tratados com bevacizumabe, a expressão de NOTCH1 esteve associada a pior SG.

Verificamos associação da marcação para NOTCH1 na membrana com a expressão de VEGFR2 citoplasmática, VEGFR3 citoplasmática, NOTCH1 citoplasmático, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$ e FAK. Enquanto que a marcação citoplasmática para NOTCH1 esteve associado a expressão de VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, NOTCH1 na membrana, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, fosfo-FAK e PI3K. É sabido que NOTCH1 pode reduzir a expressão de VEGFR2 e aumentar de VEGFR1. A interação com VEGFR3 foi citada por BENEDITO et al.

(2012). Era ainda esperada uma associação com a expressão de DLL4, que não houve. Além disso, ESTRACH et al. (2011) demonstraram, em modelos de células endoteliais humanas, que integrina $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$ ativam DLL4 e NOTCH, e que a perda de integrina α_2 e α_6 mimetiza o efeito da inibição de DLL4, com formação de vasos mal formados. Esse fato levanta a hipótese de uma possível interação entre vias de adesão mediadas por integrinas, VEGF e NOTCH no processo de controlar a função das *tip-cells* e *stalk-cells* durante a angiogênese. SCHEPPKE et al. (2012) demonstraram em camundongos, que as células do músculo liso vascular tem a sua expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ aumentada ao reconhecerem Jagged 1, ligante do Notch, nas células endoteliais, o que auxilia a adesão do músculo liso vascular à membrana basal do endotélio, dessa forma atuando na maturação dos vasos recém-formados.

Em relação ao papel das integrinas no processo da angiogênese, foi demonstrado que moléculas de integrina podem ser ativadas por VEGFA nas células endoteliais (DE et al. 2005), além de participarem da fosforilação e ativação de VEGFR2 (BYZOVA et al. 2000). Dessa maneira é de se imaginar que as integrinas devem desempenhar um papel importante no processo de angiogênese em resposta ao VEGFA e apresentarem-se como fatores importantes para progressão tumoral, e dessa forma, especular-se que a terapia anti-angiogênica poderia ser mais benéfica nos pacientes cujos tumores apresentam maior expressão de tais proteínas.

HA et al. (2014) demonstraram que a maior expressão de integrina α_v foi observada em 58,1% dos tumores de pacientes com câncer colorretal, sendo que não houve nenhum caso de hiperexpressão na mucosa normal destes mesmos pacientes. Nesse mesmo estudo, a maior expressão de integrina α_v foi um fator preditor independentemente associado com pior SLD e SG. VONLAUFEN et al. (2001)

encontraram pior SLD e SG em pacientes com câncer colorretal que expressavam integrina $\alpha_v\beta_3$ na vasculatura. Avaliando a expressão de integrina β_3 em câncer de mama localizado, DOS SANTOS et al. (2012) observaram expressão desta proteína, na membrana e citoplasma das células, em 33% dos tumores avaliados. As pacientes com hiperexpressão apresentaram pior sobrevida câncer específica. VASSOS et al. (2013) observaram expressão de integrina β_1 em 48% das células tumorais e 33% das células estromais de pacientes com câncer colorretal. Não houve correlação entre a maior expressão de integrina β_1 e sobrevida. A expressão de integrina β_1 esteve associada a pior prognóstico em câncer de ovário seroso FIGO I a IV (MÜLLER-KLINGSPOR et al. 2001). Foi demonstrado que integrina β_1 encontra-se hiperexpressa nos tumores de pacientes com glioblastoma refratários ao bevacizumabe, sugerindo um possível envolvimento desta proteína com a resistência à terapia anti-angiogênica (JAHANGIRI et al. 2014). Apesar da maioria dos estudos correlacionarem a expressão de integrina com pior prognóstico, PONTES-JÚNIOR et al. (2013) avaliaram pacientes com câncer de próstata localizado submetidos a prostatectomia radical e encontraram expressão de integrina β_1 em 79% dos casos, sendo que esses casos positivos apresentaram maior sobrevida livre de recorrência bioquímica. Nos mesmo sentido, KAUR et al. (2009) evidenciaram que a expressão de integrina β_3 , avaliada por imuno-histoquímica, nas células tumorais de pacientes com câncer de ovário foi associada a maior SLD e SG. A terapia com o inibidor de integrina $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, cilengitide, falhou em mostrar benefício num estudo fase III, onde pacientes com diagnóstico recente de glioblastoma foram randomizados entre radioterapia associada à temozolamida com ou sem cilengitide (STUPP et al. 2014). Devido aos resultados de modelos pré-clínicos e às interações entre as vias VEGF e

integrina, KIM et al. (2009) testaram a combinação de bevacizumabe (inibidor de VEGFA) e etaracizumabe (inibidor de $\alpha_v\beta_3$) de forma isolada ou combinada em modelos de câncer de ovário *in vitro* e em camundongos. Os autores observaram redução tumoral com cada terapia isolada, porém a redução foi maior com a terapia combinada. A resposta dependeu do modelo celular utilizado. Além disso, o mesmo grupo demonstrou que a via AKT pode prever a resposta ao etaracizumabe (LANDEN et al. 2008). Entretanto, não há na literatura, até o momento, estudo que tenha correlacionado a expressão de integrinas por imuno-histoquímica com os desfechos de eficácia em pacientes com câncer colorretal metastático tratados com bevacizumabe. No nosso estudo, a maior expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ esteve associada a maior SLP e a expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$ a maior SG. Esse achado pode sugerir que estas integrinas sejam marcadores de tumores mais dependentes de angiogênese onde se esperaria um maior benefício do bevacizumabe, porém não se pode descartar, baseado nos estudos citados acima, que a expressão das integrinas citadas estejam relacionadas a um melhor prognóstico, independentemente da terapia anti-angiogênica.

A expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$ esteve associada de forma significativa com a marcação para integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, fosfo-FAK, PI3K, além de VEGFR1, VEGFR2, PIGF e NOTCH1, enquanto que a expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ esteve associada à marcação para integrina $\alpha_2\beta_1$, ILK, fosfo-FAK, PI3K, além de VEGFR1, VEGFR2, PIGF e NOTCH1.

Ativação de ILK por integrinas resulta na ativação de vias que irão influenciar a motilidade, sobrevivência, transição epitélio-mesenquimal, invasão, proliferação e angiogênese (MCDONALD et al. 2008). Como ILK é inibido por

PTEN, está associado à ativação da via PI3K/AKT, e é descrito um pior prognóstico quando ocorre perda da expressão de PTEN ou ativação da via PI3K/AKT em câncer colorretal (LUO e XU 2014), poder-se-ia também esperar que o mesmo ocorresse com a maior expressão de ILK. LI et al. (2013) encontraram expressão de ILK em 42,2% dos casos de câncer colorretal por eles avaliados e isto foi um fator independentemente associado com pior SG. DAI et al. (2003) avaliaram pacientes com melanoma e encontraram que a expressão de ILK no tumor foi associada a pior SG. Marcação para ILK também está associada a pior prognóstico em câncer gástrico, pulmão, próstata, pâncreas, entre outros (HANNIGAN et al. 2011). Uma vez que a presença de ILK está associada à angiogênese, pode-se levantar a hipótese de que nesses pacientes a terapia anti-angiogênica poderia ter um papel relevante. Em nossa coorte, observamos aumento da SLP nos pacientes cujos tumores apresentaram expressão de ILK. Também não foi encontrada publicação que correlacionasse a expressão de ILK por imuno-histoquímica com desfechos em pacientes com câncer colorretal metastático tratados com bevacizumabe. ILK esteve associado à expressão de integrinas, fosfo-FAK, PI3K, VEGFR1, VEGFR2, PIGF e NOTCH, reforçando a possível interação com integrinas, ativação da via PI3K e angiogênese.

Em nosso estudo não encontramos diferença em TR, SLP ou SG em relação a expressão de fosfo-FAK. Não há publicado estudo que correlaciona a expressão de FAK com uso de bevacizumabe. Em relação à associação com os demais marcadores, a expressão de fosfo-FAK esteve associada com a expressão de integrinas, ILK e PI3K, o que sugere que a atividade dessas proteínas é interdependente. A expressão de FAK foi também associado a VEGFR1, VEGFR2,

PIGF e NOTCH, o que faz sentido já que FAK também está envolvido com angiogênese. GAROUNIATIS et al (2013b) demonstraram que houve uma correlação positiva entre a expressão de VEGFR3 e FAK, fato não observado em nosso estudo. GAROUNIATIS et al. (2013a) encontraram expressão forte de FAK entre 183 tumores de pacientes com câncer colorretal. A expressão forte foi mais comum nos estádios mais avançados (em 61% dos casos no estágio IV e 9% no estágio I). Além disso, a expressão de FAK esteve associada à pior sobrevida. Por outro lado, THEOCHARIS et al. (2003) não encontraram associação da expressão de FAK com sobrevida em pacientes com doença localizada. Devido a influência de FAK na angiogênese, seria interessante ter o conhecimento de como a expressão de FAK influencia os desfechos na terapia anti-angiogênica.

Em nosso estudo, na população global a expressão de PI3K esteve associada a maior SLP e SG, enquanto que no subgrupo de pacientes tratados em primeira linha houve associação da expressão desta proteína com maior SG. JOHNSON et al. (2010) demonstraram, através de imuno-histoquímica, que a expressão da subunidade p85 α de PI3K foi maior entre pacientes com tumores colorretais estágio IV versus I a III. Em relação a via do PI3K como possível biomarcador de resposta ao bevacizumabe, num estudo com pacientes com câncer colorretal metastático tratados com bevacizumabe, a expressão da subunidade p110 α de PI3K não esteve associado à taxa de resposta, SLP ou SG (SCLAFANI et al. 2014).

Além disso, observamos associação entre a expressão de PI3K e a marcação para integrina $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, ILK, fosfo-FAK, VEGFR1, VEGFR2 e NOTCH1. Essa associação vai de encontro a dados da literatura, reforçando a importância de PI3K nas vias de sinalização que envolvem integrinas, FAK e ILK, além da sua influência

na angiogênese, participando de vias intracelulares ativadas por VEGFR. A associação entre PI3K e NOTCH1 pode ser explicada pelo fato de que alterações na via WNT/ β -catenina interferem na expressão e atividade de NOTCH1 (RODILLA et al. 2009) e PI3K (DANIELSEN et al. 2015).

A expressão de nenhum dos marcadores avaliados, esteve associada com TR na nossa análise. Na literatura, como citado acima, também não houve associação entre a expressão por imuno-histoquímica de VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 e taxa de resposta em pacientes com câncer colorretal tratados com bevacizumabe. Não há informação em relação ao papel da expressão de PIGF, DLL4, NOTCH, ILK, FAK e PI3K.

Outra consideração importante a ser feita, é que apesar do RECIST, que leva em consideração principalmente a redução do diâmetro do tumor, ser a ferramenta indicada para avaliar resposta em estudos clínicos e a mais utilizada na prática clínica diária, o mesmo foi desenvolvido para avaliar resposta após a quimioterapia citotóxica e talvez não seja a melhor maneira para se avaliar a resposta à terapia biológica com efeito citostático, como bevacizumabe. CHUN et al. (2009) mostraram que em pacientes com câncer colorretal metastático tratados com quimioterapia e bevacizumabe, a resposta na tomografia por critério morfológico se correlacionou com SG em pacientes submetidos à ressecção da metástase hepática. Os resultados foram confirmados numa coorte de validação composta por pacientes com metástase hepática irressecável tratados com bevacizumabe. A resposta avaliada por RECIST não se correlacionou com SG em nenhuma das coortes. Uma possível explicação é que o bevacizumabe associado à quimioterapia, em comparação a quimioterapia isolada, está associado a maior taxa de resposta morfológica e maior taxa de resposta

patológica completa em metástase ressecada, fatores associados a maior SG (SHINDOH et al. 2012). Seria interessante saber como os marcadores avaliados em nosso estudo se comportam em relação à resposta ao tratamento por critério morfológico.

Levando em consideração os marcadores mais consistentes nos seus resultados em predizer eficácia ao bevacizumabe num mesmo tipo de câncer, em mais de um tipo de câncer e reproduzido por mais de um método, LAMBRECHTS et al. (2013) sugerem um perfil de biomarcadores que seria capaz de identificar os pacientes mais suscetíveis de se beneficiar do tratamento anti-angiogênico com bevacizumabe: níveis altos da isoforma curta de VEGFA no plasma, baixa expressão de VEGFR1 no plasma ou no tumor e baixa expressão de neuropilina-1 no tumor. No nosso estudo, VEGFR1 não foi relacionado com eficácia do bevacizumabe. No subgrupo tratado em primeira linha, encontramos diferença numérica na SG em relação à expressão de VEGFR1 na membrana, com mediana de 44,2 meses (baixa expressão) versus 25,2 meses (expressão alta), porém sem significância estatística ($p=0,14$) e SLP, com mediana de 12,5 meses (baixa expressão) versus 10,3 meses (hiperexpressão), porém também sem significância estatística ($p=0,46$). Nossos resultados mostram um novo perfil de pacientes que podem se beneficiar de bevacizumabe, mais precisamente, aqueles com expressão alta de VEGFR2 e baixa expressão de NOTCH1, além de expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK e PI3K.

A expressão dos marcadores pode mudar em relação ao sítio anatômico pesquisado devido o papel de cada um em relação aos processos de iniciação, invasão, progressão tumoral e metástase. Entre as proteínas avaliadas no nosso

estudo, apenas NOTCH1 citoplasmático (entre aqueles com expressão elevada, 74% ocorreu no tumor primário e 26% na metástase) e integrina $\alpha_2\beta_1$ (também entre aqueles com expressão mais alta, 70% ocorreu no tumor primário e 30% na metástase) apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão entre o tumor primário e a metástase. Entre os 14 pacientes que tinham material do tumor primário e metástase pareado disponível, não houve diferença na mediana da expressão entre os dois sítios entre os marcadores avaliados (integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, FAK e PI3K). No estudo de AL-MAGHRABI et al. (2014), VEGFR1 não apresentou diferença de expressão entre tumor primário e a metástase linfonodal. TAKAHASHI et al. (1995) encontraram maior expressão de VEGFR2 na metástase do que no tumor primário, enquanto que não houve diferença na expressão para VEGFR1. SUN et al. (2014) relataram maior expressão de integrina β_1 no tumor primário em relação a mucosa normal e maior na metástase do que no tumor primário. Integrina β_3 teve maior expressão no tumor primário em comparação a mucosa normal, porém sem diferença na expressão entre a metástase e o tumor primário. BRAVOU et al. (2006) relataram que ILK foi expresso em 98,5% dos tumores primários de cólon, com marcação moderada e forte em 72% e em 100% das metástases em linfonodo, com marcação moderada e forte em 97,8% ($p=0,001$). Não houve expressão de ILK na mucosa normal. FAK, da mesma forma, apresentou maior expressão no tumor primário em comparação a mucosa normal, porém sem diferença na expressão entre a metástase e o tumor primário. JOHNSON et al. (2010) evidenciaram que PI3K p85 α apresentou expressão mais frequente e mais intensa na metástase em relação ao tumor primário e no tumor primário em relação a mucosa normal.

Em relação a metodologia, para os marcadores, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, FAK e PI3Kp85 a leitura foi visual no microscópio e a análise para determinar a expressão do antígeno no tecido foi feita por um método semiquantitativo, utilizando um escore já utilizado e padronizado previamente para integrinas (NETO et al. 2007). Observamos que esse método, *H-score* ou outros bem semelhantes foram utilizados também na análise de ILK (BRAVOU et al. 2006), FAK (SUN et al. 2014) e PI3K (JOHNSON et al. 2010). A leitura digital facilita a análise de estruturas separadas como membrana, citoplasma e núcleo. Empregamos esse método, através do aparelho Aperio, para leitura e análise por *software* da imagem computadorizada de lâminas marcadas com anticorpos contra VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4 e NOTCH1. Esse método foi utilizado para análise de VEGFR2 por EROVIC et al. (2012). Existe uma alta concordância entre a análise por imagem digital e a realizada por microscopia óptica na interpretação de cortes histológicos preparados com hematoxilina-eosina (KRISHNAMURTHY et al. 2013) e imuno-histoquímica com avaliação de HER2 por exemplo (NUNES et al. 2014). Os anticorpos que utilizamos foram para fins de pesquisa, contudo, a análise histológica ou imuno-histoquímica através de método de imagem digital de algo já consagrado para uso rotineiro na microscopia óptica deve passar por um processo de validação, conforme orientado por PANTANOWITZ et al. (2013), no intuito de não comprometer o cuidado com o paciente.

Levando-se em conta os possíveis sítios de localização e estado de ativação da proteína, a avaliação do antígeno por imuno-histoquímica pode ser um desafio. Por exemplo, VEGFR1 é expresso em células endoteliais, monócitos, pericitos, e células tumorais (MARIEN et al. 2015). CHENG et al. (2004) relataram que a

expressão de VEGFR1 foi observada principalmente no citoplasma das células tumorais de pacientes com metástase hepática de câncer colorretal. VEGFR2 é expresso em células tumorais e vasos sanguíneos e linfáticos tumorais. MARTINS et al. (2013) mostraram expressão de VEGFR3 nas células tumorais em 24% dos pacientes. SUNG et al. (2012) avaliaram a expressão de PlGF no núcleo das células tumorais. O escore utilizado foi intensidade de marcação 0 a 4. Foi considerado negativo 0 ou 1 e positivo 2 a 4. Em câncer de pulmão, por exemplo, ZHANG et al. (2005) relataram que a marcação de PlGF por imuno-histoquímica nas células tumorais foi principalmente citoplasmática, sendo positiva em 38,5% dos casos. JUBB et al. (2009) demonstraram DLL4 positivo (considerado qualquer marcação no endotélio como positivo) no citoplasma da célula endotelial do tumor e em 16% das células tumorais (considerado positivo se marcação semelhante a marcação endotelial), sendo que houve marcação na membrana e citoplasma. Nas células tumorais a expressão foi mais frequente nas *goblet cells*. CHU et al. (2010) observaram marcação para NOTCH1 em membrana e citoplasma. BRAVOU et al. (2006) encontraram marcação para ILK difusa e confinada ao citoplasma. Em relação a marcação de PI3K p85, JOHNSON et al. (2010) demonstraram que a marcação é citoplasmática.

No estudo realizado por THEOCHARIS et al. (2003) onde a expressão de FAK foi avaliada no câncer colorretal, a marcação foi principalmente no citoplasma e, ocasionalmente, na membrana. ARONSOHN et al. (2003) encontraram expressão de FAK e fosfo-FAK (pY397) em pacientes com carcinoma de células escamosas de laringe. De forma surpreendente, a marcação de fosfo-FAK foi nuclear na maioria dos casos. MURATA et al. (2008) encontraram marcação de FAK no citoplasma, em

pacientes com câncer de cólon, porém, como no carcinoma de laringe citado acima, a expressão de fosfo-FAK (anti-pY397 FAK) também foi nuclear, fato que pode estar relacionado a função das proteínas carreadoras de FAK, como Hic-5 e Zyxin, sugerindo ativação da via. Em glioma tanto a expressão de FAK, como de fosfo-FAK (pY397) esteve associada a pior sobrevida (DING et al. 2010). O anticorpo utilizado em nosso estudo foi fosfo-FAK (S910). Autofosforilação de FAK na Tyr-397 cria um sítio de ligação para tirosina quinase Src. Subsequente fosforilação, mediada por SRC, de FAK nos sítios Tyr-576, Tyr-577, Tyr-861 e Tyr-925 são importantes para máxima ativação de FAK e fosforilação em Tyr-397 que irá ativar vias intracelulares como PI3K por exemplo. Este modelo de ativação é considerado o principal na sinalização via FAK. Contudo, JIANG et al. (2007), em modelo *in vitro* em células de epiteliais do intestino, indicam que Ser-910 e Ser-843 são sítios de fosforilação mais importantes em resposta a promotores de tumor e fatores de crescimento do que Tyr-397. Outra informação importante, é que PAK1 (*p21-activated kinase 1*) é relacionada a pior prognóstico em câncer colorretal e induz metástase *in vitro* em células de câncer colorretal por ativar ERK, que por sua vez fosforila FAK na Ser-910 (LI et al. 2010). ZHONG et al. (2008), em modelo de cardiomiopatia hipertrófica em camundongos, mostraram que após FAK ser fosforilada na Ser910, ela é translocada e acumulada no núcleo dos miócitos.

Ainda sobre dificuldades com a técnica de imuno-histoquímica e sítio de expressão do marcador, SMITH et al. (2010), devido aos resultados contraditórios encontrados na literatura sobre a expressão por imuno-histoquímica de VEGFR2 e VEGFR3 no tumor e nos vasos, fizeram um interessante trabalho. Selecionaram 12 anticorpos de VEGFR2 (n=8) e VEGFR3 (n=4) com base nas recomendações dos

fabricantes ou literatura. Entre os oito anticorpos testados, apenas 55B11 foi VEGFR2 específico e qualificado para o uso em imuno-histoquímica, e AF349 para VEGFR3. Os dois receptores foram expressos nos vasos relacionados ao tumor e não foram expressos nas células malignas de 13 tipos de câncer sólido de pacientes (incluindo 65 casos de câncer colorretal). Além disso, em câncer colorretal, VEGFR2 foi expresso em vasos sanguíneos e linfáticos, enquanto VEGFR3 foi expresso predominantemente em vasos linfáticos intratumorais. Os autores acreditam que a alta expressão de VEGFR2 nas células tumorais em diversos estudos publicados é devida à reatividade cruzada desses anticorpos com antígenos proteicos não específicos. A mesma situação ocorre com VEGFR3. Apesar de não testado nesse estudo, o clone 9D9F9 também é específico para VEGFR3. Os anticorpos anti-VEGFR2 e anti-VEGFR3 que foram utilizados no nosso estudo não estão entre os não recomendados nesse artigo.

Além da especificidade do anticorpo, outros fatores também devem ser levados em conta, como qualidade do material histológico e técnica de recuperação do antígeno, porque podem influenciar a acurada detecção do epítipo (SMITH et al. 2010).

Para avaliar a consistência interna dos resultados encontrados, escolhemos outros 50 pacientes portadores de câncer colorretal metastático tratados com bevacizumabe. Entretanto, a análise dos marcadores foi realizada numa subcoorte com 31 pacientes. O tempo de seguimento foi mais curto, entretanto as demais características foram semelhantes. Os achados clínicos associados com TR e SLP na amostra dos casos não foram confirmados na coorte de validação. Entre os achados clínicos associados com SG no grupo casos, ECOG, grau histológico, metástase

sincrônica ao diagnóstico, presença de metástase hepática versus outros sítios de metástase, ausência de metástase linfonodal, ser submetido à cirurgia do tumor primário versus tratamento com primário não operado, ressecção de metástase e *KRAS* selvagem, apenas ECOG e ressecção de metástase foram confirmados na coorte de validação. Não houve associação dos marcadores por imuno-histoquímica com TR (foram pesquisados VEGFR2, NOTCH1, integrina $\alpha_2\beta_1$, ILK, FAK e PI3K), assim como não houve no grupo casos. A marcação para VEGFR2 de membrana e baixa expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$ estiveram associados a maior SLP, porém não foi confirmada as associações com nenhum dos marcadores do grupo-casos (VEGFR2 no citoplasma, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK e PI3K). Não houve associação de marcadores imuno-histoquímicos no grupo de validação com SG, enquanto que no grupo-casos, baixa expressão de NOTCH1 na membrana, expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$ e de PI3K estiveram associados a maior SG. A análise multivariada para SG no grupo de validação confirmou o achado do grupo-casos com a ressecção de metástase hepática como fator prognóstico independente. A diferença nos resultados encontrados talvez seja explicada pelo pequeno número de casos na coorte de validação, o que gera maior heterogeneidade, e ao seguimento mais curto nesta coorte.

Em relação às limitações do nosso estudo, a maioria delas são vieses inerentes a um estudo retrospectivo. Trata-se de uma análise onde as informações clínicas e resultados de exames de imagem foram coletados dos prontuários. Os pacientes receberam tratamento em diversas linhas de tratamento e na tentativa de minimizar o impacto dos tratamentos posteriores fizemos uma análise apenas com os pacientes tratados em primeira linha. O material anátomo-patológico utilizado foi o disponível, nem sempre correspondendo ao momento do início do bevacizumabe,

além disso a maioria do material patológico utilizado foi proveniente do tumor primário. Sabendo que há diferença de expressão de diversos marcadores, incluindo os utilizados nesse estudo, em relação ao estágio da doença, fizemos uma comparação entre a positividade dos marcadores testados em sítio metastático versus tumor primário para tentar minimizar esse possível viés. Os casos inseridos no TMA foram alocados em duplicata para alcançar uma média da expressão e minimizar o percentual de casos sem resultado. Realizamos ainda as análises num grupo de pacientes independente, mas com características clínicas semelhantes, no intuito de validar internamente os resultados. As análises foram realizadas e os resultados relatados de acordo com o REMARK (MALLETT et al. 2010).

Esperamos que os resultados obtidos nesta análise auxiliem no melhor entendimento da interação entre proteínas associadas com a promoção e regulação da angiogênese e à resposta e eficácia do tratamento com terapia antiangiogênicas, notadamente à terapia com bevacizumabe.

7 CONCLUSÃO

- 1 Em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia associada ao bevacizumabe não houve associação entre os marcadores estudados e taxa de resposta, contudo a hiperexpressão por imuno-histoquímica, no tumor de VEGFR2, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK e PI3Kp85, esteve associada a maior sobrevida livre de progressão, enquanto que baixa expressão de NOTCH1 e a hiperexpressão de integrina $\alpha_2\beta_1$ e PI3K esteve associada a maior sobrevida global.
- 2 As seguintes características clínicas e patológicas estiveram associadas a maior taxa de resposta: histologia não produtora de mucina, grau 1 e 2 (versus 3), tumor primário localizado à esquerda e presença de metástase hepática (versus ausência de metástase hepática com presença em outros sítios). As características associadas a maior sobrevida livre de progressão foram: ECOG 0 ou 1 (versus 2 ou 3), tumor primário localizado à esquerda, ter sido submetido a cirurgia do tumor primário e ausência de metástase em linfonodo. As características associadas a maior sobrevida global foram: ECOG 0 ou 1 (versus 2 ou 3), grau 1 e 2 versus 3, ter sido submetido a cirurgia do tumor primário, ausência de metástase em linfonodo, presença de metástase hepática, metástase sincrônica, ressecção de metástase e KRAS selvagem.
- 3 Metástase pulmonar esteve associada a expressão de VEGFR1 na membrana, VEGFR1 no citoplasma, VEGFR3 na membrana e VEGFR3 no citoplasma;

metástase sincrônica com VEGFR1 no citoplasma, VEGFR3 na membrana e PIGF. Grau 3 com VEGFR3 na membrana. Tumor no cólon direito esteve associado à marcação para NOTCH1 no citoplasma. Hipertensão arterial sistêmica esteve associada à expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$, metástase em peritônio com ILK; linfonodo regional comprometido ao diagnóstico com PI3Kp85 e histologia produtora de mucina com expressão de integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, fosfo-FAK e PI3K.

- 4 Todos os VEGFRs se correlacionaram entre si. PIGF esteve associado com VEGFR1, NOTCH1, integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK e FAK. Não houve associação de DLL4 com nenhum marcador. NOTCH na membrana esteve associado a expressão no citoplasma de VEGFR 2 e 3, porém não na membrana, além de estar associado a expressão de integrinas e de FAK. NOTCH1 no citoplasma esteve associado a todos os marcadores, exceto DLL4. Integrinas estiveram associadas a VEGFR1, VEGFR2, ILK, FAK e PI3K, além das associações citadas acima. ILK também foi associado a expressão de VEGFR1, VEGFR2, FAK e PI3K, além das associações citadas acima. FAK e PI3K também estiveram associados entre si, associados com VEGFR1, VEGFR2, além de outras associações citadas acima com esses marcadores.
- 5 *KRAS* mutado no éxon 2 esteve presente em 41% dentre os 102 pacientes. Não houve associação do *status* mutacional do *KRAS* com sexo, localização do tumor primário, histologia, grau histológico, metástase sincrônica ou metacrônica, sítio de metástase (hepática, pulmonar, linfonodal ou peritônio), ressecção de metástase e desenvolvimento de HAS. Presença de mutação do

KRAS não foi associada a taxa de resposta, mas houve uma tendência a associação com pior SLP (9 meses versus 11,8 meses, $p=0,06$) e esteve associada a pior SG (22 meses *KRAS* mutado versus 37 meses *KRAS* selvagem, $p=0,01$). Não houve associação do *status* do *KRAS* com a expressão de nenhum dos marcadores avaliados por imuno-histoquímica.

- 6 No subgrupo de pacientes tratados em primeira linha com quimioterapia associada a bevacizumabe, as seguintes características clínicas e patológicas estiveram associadas a maior taxa de resposta: metástase sincrônica (versus metacrônica), tumor primário localizado à esquerda (cólon descendente, sigmóide ou reto) e presença de metástase hepática (comparado com presença de metástase em outros sítios ou sem metástase hepática). As características associadas a maior sobrevida livre de progressão foram: grau histológico 1 e 2 (versus 3), ter sido submetido à cirurgia do tumor primário e desenvolver HAS durante o tratamento com bevacizumabe. As características associadas a maior sobrevida global foram: grau 1 ou 2 (versus 3), metástase sincrônica ao diagnóstico, presença de metástase hepática versus outros sítios de metástase, ausência de metástase pulmonar e ressecção de metástase. Não houve associação entre os marcadores estudados e taxa de resposta, nem com sobrevida livre de progressão. Entretanto, a baixa expressão de PIGF, baixa expressão de NOTCH1 e a hiperexpressão de PI3K estiveram associadas a maior sobrevida global.
- 7 A hiperexpressão (>mediana) de NOTCH1 no citoplasma foi mais frequente no tumor primário do que na metástase (74% versus 26% respectivamente, $p=0,01$). A hiperexpressão (moderado a forte) de integrina $\alpha_2\beta_1$ foi mais

frequente no tumor primário do que na metástase (70% versus 30% respectivamente, $p=0,03$). Os demais marcadores não tiveram diferença significativa de expressão entre o tumor primário e da metástase. Entre os 14 pacientes que tinham material disponível de tumor primário e metástase, foi realizada a avaliação de integrina $\alpha_2\beta_1$, integrina $\alpha_v\beta_3$, ILK, fosfo-FAK e PI3K. Não houve diferença na expressão desses marcadores entre tumor primário e metástase.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam R, Avisar E, Ariche A, et al. Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. **Ann Surg Oncol** 2001; 8:347-53.

Adam R, Delvart V, Pascal G, et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. **Ann Surg** 2004; 240:644-57.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. 5° ed. 2010a. Comunicação celular; p.932-5.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. 5° ed. 2010b. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular; p.1169-78.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. 5° ed. 2010c. Células germinativas e fecundação; p.1252-3.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. 5° ed. 2010d. Câncer; p.1448-9.

Al-Maghrabi J, Gomaa W, Buhmeida A, et al. Prognostic significance of VEGFR1/Flt-1 immunoexpression in colorectal carcinoma. **Tumour Biol** 2014; 35:9045-51.

Aprile G, Rijavec E, Fontanella C, et al. Ramucirumab: preclinical research and clinical development. **Onco Targets Ther** 2014; 7:1997-2006.

Aronsohn MS, Brown HM, Hauptman G, et al. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. **Laryngoscope** 2003; 113:1944-8.

Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, et al. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. **Anticancer Res** 2008; 28:3865-70.

Bendell JC, Bekaii-Saab TS, Cohn AL, et al. Treatment patterns and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer initially treated with FOLFOX-bevacizumab or FOLFIRI-bevacizumab: results from ARIES, a bevacizumab observational cohort study. **Oncologist** 2012; 17:1486-95.

Benedito R, Rocha SF, Woeste M, et al. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. **Nature** 2012; 484:110-4.

Bennouna J, Sastre J, Arnold D, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2013; 14:29-37.

Boisen MK, Johansen JS, Dehlendorff C, et al. Primary tumor location and bevacizumab effectiveness in patients with metastatic colorectal cancer. **Ann Oncol** 2013; 24:2554-9.

Bravou V, Klironomos G, Papadaki E, et al. ILK over-expression in human colon cancer progression correlates with activation of beta-catenin, down-regulation of E-cadherin and activation of the Akt-FKHR pathway. **J Pathol** 2006; 208:91-9.

Bruhn MA, Townsend AR, Khoon Lee C, et al. Proangiogenic tumor proteins as potential predictive or prognostic biomarkers for bevacizumab therapy in metastatic colorectal cancer. **Int J Cancer** 2014; 135:731-41.

Brzozowa M, Wojnicz R1, Kowalczyk-Ziomek G, et al. The Notch ligand Delta-like 4 (DLL4) as a target in angiogenesis-based cancer therapy? [abstract] **Contemp Oncol (Pozn)** 2013; 17:234-7.

Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of integrins. **Mol Cell** 2000; 6:851-60.

Cai J, Ma H, Huang F, et al. Correlation of bevacizumab-induced hypertension and outcomes of metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab: a systematic review and meta-analysis. **World J Surg Oncol** 2013; 11:306.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature** 2012; 487:330-7.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature** 2011; 473:298-307.

Carrato A, Swieboda-Sadlej A, Staszewska-Skurczynska M, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus either sunitinib or placebo in metastatic colorectal cancer: a randomized, phase III trial. **J Clin Oncol** 2013; 31:1341-7.

Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2029.

Cheng J, Slavin RE, Gallagher JA, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and receptor flk-1 in colon cancer liver metastases. **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 2004; 11:164-70.

Chu D, Li Y, Wang W, et al. High level of Notch1 protein is associated with poor overall survival in colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1337-42.

Chu D, Zhang Z, Zhou Y, et al. Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. **Ann Oncol** 2011; 22:2440-7.

Chun YS, Vauthey JN, Boonsirikamchai P, et al. Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. **JAMA** 2009; 302:2338-44.

Ciombor KK, Berlin J, Chan E. Aflibercept. **Clin Cancer Res** 2013; 19:1920-5.

Clarke JM, Hurwitz HI, Rangwala F. Understanding the mechanisms of action of antiangiogenic agents in metastatic colorectal cancer: a clinician's perspective. **Cancer Treat Rev** 2014; 40:1065-72.

Cunningham D, Lang I, Marcuello E, et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2013; 14:1077-85.

Dai DL, Makretsov N, Campos EI, et al. Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival. **Clin Cancer Res** 2003; 9:4409-14.

Danielsen SA, Eide PW, Nesbakken A, et al. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1855:104-21.

De S, Razorenova O, McCabe NP, et al. VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:7589-94.

Dellinger MT, Brekken RA. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 is required for VEGF-A/VEGFR2-induced proliferation and migration of lymphatic endothelium. **PLoS One** 2011; 6:e28947.

Ding L, Sun X, You Y, et al. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in human gliomas is associated with unfavorable overall survival. **Transl Res** 2010; 156:45-52.

Domingo E, Church DN, Sieber O, et al. Evaluation of PIK3CA mutation as a predictor of benefit from nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2013; 31:4297-305.

dos Santos PB, Zanetti JS, Ribeiro-Silva A, et al. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. **Diagn Pathol** 2012; 7:104.

Duda DG, Jain RK. Premetastatic lung "niche": is vascular endothelial growth factor receptor 1 activation required? **Cancer Res** 2010; 70:5670-3.

Duda DG, Willett CG, Ancukiewicz M, et al. Plasma soluble VEGFR-1 is a potential dual biomarker of response and toxicity for bevacizumab with chemoradiation in locally advanced rectal cancer **Oncologist** 2010; 15:577-83.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Colon and rectum; p.143-59.

Edwards LA, Woo J, Huxham LA, et al. Suppression of VEGF secretion and changes in glioblastoma multiforme microenvironment by inhibition of integrin-linked kinase (ILK). **Mol Cancer Ther** 2008; 7:59-70.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). **Eur J Cancer** 2009; 45:228-47.

Ellis LM. Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. **Semin Oncol** 2006; 33(5 Suppl 10):S1-7.

Erovic BM, Harris L, Jamali M, et al. Biomarkers of parathyroid carcinoma. **Endocr Pathol** 2012; 23:221-31.

Eskander RN, Tewari KS. Beyond angiogenesis blockade: targeted therapy for advanced cervical cancer. **J Gynecol Oncol** 2014; 25:249-59.

Estrach S, Cailleteau L, Franco CA, et al. Laminin-binding integrins induce Dll4 expression and Notch signaling in endothelial cells. **Circ Res** 2011; 109:172-82.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med** 2003; 9:669-76.

Ferrarotto R, Hoff PM. Antiangiogenic drugs for colorectal cancer: exploring new possibilities. **Clin Colorectal Cancer** 2013; 12:1-7.

Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? **Nat Rev Cancer** 2008; 8:942-56.

Foerzler D, Delmar P, Kockx M, et al. Tumor tissue based biomarker analysis in NO16966: a randomized phase III study of first-line bevacizumab in combination with oxaliplatin based chemotherapy in patients with mCRC. In: **2010 Gastrointestinal Cancers Symposium**, 2010; jan 22-24, 2010 (abstr 374).

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med** 1971; 285:1182-6.

Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U, et al. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. **Semin Cancer Biol** 2009; 19:298-309.

Fu G, Wang W, Luo BH. Overview: structural biology of integrins. **Methods Mol Biol** 2012; 757:81-99.

Garouniatis A, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, et al. FAK, CD44v6, c-Met and EGFR in colorectal cancer parameters: tumour progression, metastasis, patient survival and receptor crosstalk. **Int J Colorectal Dis** 2013a; 28:9-18.

Garouniatis A, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, et al. Vascular endothelial growth factor receptors 1,3 and caveolin-1 are implicated in colorectal cancer aggressiveness and prognosis--correlations with epidermal growth factor receptor, CD44v6, focal adhesion kinase, and c-Met. **Tumour Biol** 2013b; 34:2109-17.

Gerger A, El-Khoueiry A, Zhang W, et al. Pharmacogenetic angiogenesis profiling for first-line bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2011; 17:5783-792.

Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. **Development** 2011; 138:4569-83.

Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. **J Clin Oncol** 2007; 25:1539-44.

Goede V, Coutelle O, Neuneier J, et al. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. **Br J Cancer** 2010; 103:1407-14.

Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM, et al. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). **J Clin Oncol** 2008; 26:5326-34.

Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet** 2013; 381:303-12.

Grothey A, Flick ED, Cohn AL, et al. Bevacizumab exposure beyond first disease progression in patients with metastatic colorectal cancer: analyses of the ARIES observational cohort study. **Pharmacoepidemiol Drug Saf** 2014; 23:726-34.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. **N Engl J Med** 2000; 342:69-77.

Ha SY, Shin J, Kim JH, et al. Overexpression of integrin αv correlates with poor prognosis in colorectal cancer. **J Clin Pathol** 2014; 67:576-81.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Hannigan GE, McDonald PC, Walsh MP, et al. Integrin-linked kinase: not so 'pseudo' after all. **Oncogene** 2011; 30:4375-85.

Hansen TF, Christensen RD, Andersen RF, et al. The predictive value of single nucleotide polymorphisms in the VEGF system to the efficacy of first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: Results from the Nordic ACT trial. **Int J Colorectal Dis** 2012; 27:715-20.

Heerkens EH, Quinn L, Withers SB, et al. β Integrins mediate FAK Y397 autophosphorylation of resistance arteries during eutrophic inward remodeling in hypertension. **J Vasc Res** 2014; 51:305-14.

Hegde PS, Jubb AM, Chen D, et al. Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. **Clin Cancer Res** 2013; 19:929-37.

Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:1065-75.

Hernandez SL, Banerjee D, Garcia A, et al. Notch and VEGF pathways play distinct but complementary roles in tumor angiogenesis. **Vasc Cell** 2013; 5:17.

Hirashima Y, Yamada Y, Tateishi U, et al. Pharmacokinetic parameters from 3-Tesla DCE-MRI as surrogate biomarkers of antitumor effects of bevacizumab plus FOLFIRI in colorectal cancer with liver metastasis. **Int J Cancer** 2012; 130:2359-65.

Hoff PM1, Hochhaus A, Pestalozzi BC, et al. Cediranib plus FOLFOX/CAPOX versus placebo plus FOLFOX/CAPOX in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: a randomized, double-blind, phase III study (HORIZON II). **J Clin Oncol** 2012; 30:3596-603.

Homsy J, Daud AI. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. **Cancer Control** 2007; 14:285-94.

Hu W, Lu C, Dong HH, et al. Biological roles of the Delta family Notch ligand Dll4 in tumor and endothelial cells in ovarian cancer. **Cancer Res** 2011; 71:6030-9.

Huang L, Liu Z, Deng D, et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody-based therapy for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of the effect of PIK3CA mutations in KRAS wild-type patients. **Arch Med Sci** 2014; 10:1-9.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med** 2004; 350:2335-42.

Hwang R, Varner J. The role of integrins in tumor angiogenesis. **Hematol Oncol Clin North Am** 2004; 18:991-1006.

Jahangiri A, Aghi MK, Carbonell WS, et al. β 1 integrin: Critical path to antiangiogenic therapy resistance and beyond. **Cancer Res** 2014; 74:3-7.

Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. **J Clin Oncol** 2013; 31:2205-18.

Jayson GC, de Haas S, Delmar P, et al. Evaluation of plasma VEGF-A as a potential predictive pan-tumour biomarker for bevacizumab. **Eur J Cancer** 2011; 47:S804. [Presented at 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress; 2011; Sep 23-27, Stockholm, Sweden]

Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. **J Cell Sci** 2014; 127:923-8.

Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69.

Jiang X, Sinnott-Smith J, Rozengurt E, et al. Differential FAK phosphorylation at Ser-910, Ser-843 and Tyr-397 induced by angiotensin II, LPA and EGF in intestinal epithelial cells. **Cell Signal** 2007; 19:1000-10.

Johnson SM, Gulhati P, Rampy BA, et al. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. **J Am Coll Surg** 2010; 210:767-8.

Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, et al. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment

effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:217-27.

Jubb AM, Turley H, Moeller HC, et al. Expression of delta-like ligand 4 (Dll4) and markers of hypoxia in colon cancer. **Br J Cancer** 2009; 101:1749-57.

Jubb AM, Miller KD, Rugo HS, et al. Impact of exploratory biomarkers on the treatment effect of bevacizumab in metastatic breast cancer. **Clin Cancer Res** 2011; 17:372-81.

Kara O, Duman BB, Kara B, et al. Analysis of PTEN, VEGF, HER2 and P53 status in determining colorectal cancer benefit from bevacizumab therapy. **Asian Pac J Cancer Prev** 2012; 13:6397-401.

Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in angiogenesis. **Front Mol Neurosci** 2011; 4:51.

Kaur S, Kenny HA, Jagadeeswaran S, et al. β 3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. **Am J Pathol** 2009;175:2184-96.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. **N Engl J Med** 2008; 358:2039-49.

Kim SH, Shin SJ, Lee KY, et al. Prognostic value of mucinous histology depends on microsatellite instability status in patients with stage III colon cancer treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy: a retrospective cohort study. **Ann Surg Oncol** 2013; 20:3407-13.

Kim TJ, Landen CN, Lin YG, et al. Combined anti-angiogenic therapy against VEGF and integrin α V β 3 in an orthotopic model of ovarian cancer. **Cancer Biol Ther** 2009; 8:2263-72.

Koopman M, Simkens L, May A, et al. Final results and subgroup analyses of the phase 3 CAIRO3 study: Maintenance treatment with capecitabine and bevacizumab versus observation after induction treatment with chemotherapy and bevacizumab in metastatic colorectal cancer (mCRC). **J Clin Oncol** 2014; 32(suppl 3):ALBA388. [Presented at 2014 Gastrointestinal Cancers Symposium 2014; Jan 16-18, San Francisco, California].

Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. **J Clin Oncol** 2009; 27:3677-83.

Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. **J Clin Oncol** 2010; 28:453-9.

Koutras AK, Antonacopoulou AG, Eleftheraki AG, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan based chemotherapy and bevacizumab. **Pharmacogenomics J** 2012; 12:468-75.

Kozloff M, Yood MU, Berlin J, et al. Clinical outcomes associated with bevacizumab-containing treatment of metastatic colorectal cancer: the BRiTE observational cohort study. **Oncologist** 2009; 14:862-70.

Krishnamurthy S, Mathews K, McClure S, et al. Multi-institutional comparison of whole slide digital imaging and optical microscopy for interpretation of hematoxylin-eosin-stained breast tissue sections. **Arch Pathol Lab Med** 2013; 137:1733-9.

Lambrechts D, Delmar P, Miles DW, et al. Single nucleotide polymorphism analysis and outcome in advanced stage cancer patients treated with bevacizumab. **Eur J Cancer** 2011; 47:S173. [Presented at 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress; 2011; Sep 23-27, Stockholm, Sweden]

Lambrechts D, Claes B, Delmar P, et al. VEGF pathway genetic variants as biomarkers of treatment outcome with bevacizumab: an analysis of data from the AViTA and AVOREN randomised trials. **Lancet Oncol** 2012; 13:724-33.

Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, Carmeliet P, Scherer SJ. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. **J Clin Oncol** 2013; 31:1219-30.

Lampropoulou A, Ruhrberg C. Neuropilin regulation of angiogenesis. **Biochem Soc Trans** 2014; 42:1623-8.

Landen CN, Kim TJ, Lin YG, et al. Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of α v β 3 integrin in ovarian cancer. **Neoplasia** 2008; 10:1259-67.

Lenz H, Niedzwiecki D, Innocenti F, et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of FOLFIRI or mFOLFOX6 with bevacizumab or cetuximab for patients with expanded RAS analyses in untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum. **J Clin Oncol** 2014; 32:(5 suppl): LBA3. [Presented at 2014 ASCO Annual Meeting; 2014; may 30-Jun 3].

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science** 1989; 246:1306-9.

Li LH, Zheng MH, Luo Q, et al. P21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910. **Int J Oncol** 2010; 37:951-62.

Li R, Liu B, Yin H, et al. Overexpression of integrin-linked kinase (ILK) is associated with tumor progression and an unfavorable prognosis in patients with colorectal cancer. **J Mol Histol** 2013; 44:183-9.

Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. **N Engl J Med** 2012a; 367:1596-606.

Liao X, Morikawa T, Lochhead P, et al. Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. **Clin Cancer Res** 2012b; 18:2257-68.

Lieu CH, Tran H, Jiang ZQ, et al. The association of alternate VEGF ligands with resistance to anti-VEGF therapy in metastatic colorectal cancer. **PLoS One** 2013; 8:e77117.

Liu CJ, Lin JK, Chen WS, et al. The efficacy of chemotherapy in patients with high-grade metastatic colon cancer. **Hepatogastroenterology** 2011; 58:1495-501.

Lo Giudice L, Di Salvatore M, Astone A, et al. Polymorphisms in VEGF, eNOS, COX-2, and IL-8 as predictive markers of response to bevacizumab. **J Clin Oncol** 2010; 28(suppl):Ae13502. [Presented at 2010 ASCO Annual Meeting, June 4 - 8, 2010; Chicago, Illinois]

Loupakis F, Cremolini C, Fioravanti A, et al. Pharmacodynamic and pharmacogenetic angiogenesis related markers of first-line FOLFOXIRI plus bevacizumab schedule in metastatic colorectal cancer. **Br J Cancer** 2011; 104:1262-9.

Loupakis F, Cremolini C, Yang D, et al. Prospective validation of candidate SNPs of VEGF/VEGFR pathway in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus bevacizumab. **PLoS One** 2013; 8:e66774.

Loupakis F, Cremolini C, Masi G, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med** 2014; 371:1609-18.

Loupakis F, Yang D, Yau L, et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2015; 107:pii: dju427.

Luo HY, Xu RH. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in advanced colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 2014; 20:3858-74.

Mahabeleshwar GH, Feng W, Phillips DR, et al. Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. **J Exp Med** 2006; 203:2495-507.

Mahabeleshwar GH, Feng W, Reddy K, et al. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. **Circ Res** 2007; 101:570-80.

Mahabeleshwar GH, Chen J, Feng W, et al. Integrin affinity modulation in angiogenesis. **Cell Cycle** 2008; 7:335-47.

Mallett S, Timmer A, Sauerbrei W, et al. Reporting of prognostic studies of tumour markers: a review of published articles in relation to REMARK guidelines. **Br J Cancer** 2010; 102:173-80.

Manzoni M, Comolli G, Torchio M, et al. Circulating endothelial cells and their subpopulations: role as predictive biomarkers in antiangiogenic therapy for colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer** 2015; 14:11-7.

Marien KM, Croons V, Martinet W, et al. Predictive tissue biomarkers for bevacizumab-containing therapy in metastatic colorectal cancer: an update. **Expert Rev Mol Diagn** 2015; 13:1-16.

Martins SF, Garcia EA, Luz MA, et al. Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer. **Cancer Genomics Proteomics** 2013; 10:55-67.

Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, et al. Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. **Cancer Chemother Pharmacol** 2011; 68:763-8.

McDonald PC, Fielding AB, Dedhar S, et al. Integrin-linked kinase-essential roles in physiology and cancer biology. **J Cell Sci** 2008; 121:3121-32.

Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. **N Engl J Med** 2005; 352:476-87.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Mok T, Gorbunova V, Juhasz E, et al. A correlative biomarker analysis of the combination of bevacizumab and carboplatin-based chemotherapy for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer: results of the phase II randomized ABIGAIL study (BO21015). **J Thorac Oncol** 2014; 9:848-55.

Müller-Klingspor V, Hefler L, Obermair A, et al. Prognostic value of beta1-integrin (=CD29) in serous adenocarcinomas of the ovary. **Anticancer Res** 2001; 21:2185-8.

Murata T, Naomoto Y, Yamatsuji T, et al. Localization of FAK is related with colorectal carcinogenesis. **Int J Oncol** 2008; 32:791-6.

Neto DS, Pantaleão L, de Sá BC, et al. Alpha-v-beta3 integrin expression in melanocytic nevi and cutaneous melanoma. **J Cutan Pathol** 2007; 34:851-6.

Niland S, Eble JA. Integrin-mediated cell-matrix interaction in physiological and pathological blood vessel formation. **J Oncol** 2012; 2012:125278.

Nunes C, Rocha R, Buzelin M, et al. High agreement between whole slide imaging and optical microscopy for assessment of HER2 expression in breast cancer: whole

slide imaging for the assessment of HER2 expression. **Pathol Res Pract** 2014; 210:713-8.

Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. **Cancer Res** 2005; 65:3967-79.

Ou JJ, Wei X, Peng Y, et al. Neuropilin-2 mediates lymphangiogenesis of colorectal carcinoma via a VEGFC/VEGFR3 independent signaling. **Cancer Lett** 2015; 358:200-9.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Lancet** 1889; 1:571-3.

Pantanowitz L, Sinard JH, Henricks WH, et al. Validating whole slide imaging for diagnostic purposes in pathology: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. **Arch Pathol Lab Med** 2013; 137:1710-22.

Phillips WA, St Clair F, Munday AD, et al. Increased levels of phosphatidylinositol 3-kinase activity in colorectal tumors. **Cancer** 1998; 83:41-7.

Pohl M, Werner N, Munding J, et al. Biomarkers of anti-angiogenic therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC): original data and review of the literature. **Z Gastroenterol** 2011; 49:1398-406.

Pontes-Júnior J, Reis ST, Bernardes FS, et al. Correlation between beta1 integrin expression and prognosis in clinically localized prostate cancer. **Int Braz J Urol** 2013; 39:335-42; discussion 343.

Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ, et al. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:338-51.

Reinacher-Schick A, Pohl M, Schmiegel W. Drug insight: antiangiogenic therapies for gastrointestinal cancers--focus on monoclonal antibodies. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol** 2008; 5:250-67.

Rey JB, Launay-Vacher V, Tournigand C. Regorafenib as a single-agent in the treatment of patients with gastrointestinal tumors: an overview for pharmacists. **Target Oncol** 2015; 10:199-213.

Ridgway J, Zhang G, Wu Y, et al. Inhibition of DLL4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. **Nature** 2006; 444:1083-7.

Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, et al. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:6315-20.

Ronzoni M, Manzoni M, Mariucci S, et al. Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as predictive markers of clinical response to bevacizumab-based first-line treatment in advanced colorectal cancer patients. **Ann Oncol** 2010; 21:2382-9.

Rychahou PG, Jackson LN, Silva SR, et al. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. **Ann Surg** 2006; 243:833-42; discussion 843-4.

Rylova SN, Barnucz E, Fani M, et al. Does imaging $\alpha v \beta 3$ integrin expression with PET detect changes in angiogenesis during bevacizumab therapy? **J Nucl Med** 2014; 55:1878-84.

Saito N, Aoki K, Hirai N, et al. Effect of Notch expression in glioma stem cells on therapeutic response to chemo-radiotherapy in recurrent glioblastoma. **Brain Tumor Pathol** 2015 Feb 10. [Epub ahead of print]

Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. **J Clin Oncol** 2008; 26:2013-9.

Sato Y. Delta-like 4 and vasohibin 1: two endothelium-produced negative regulators of angiogenesis with distinctive roles. **Eur Cytokine Netw** 2009; 20:220-4.

Scheppke L, Murphy EA, Zarpellon A, et al. Notch promotes vascular maturation by inducing integrin-mediated smooth muscle cell adhesion to the endothelial basement membrane. **Blood** 2012; 119:2149-58.

Schmoll HJ, Cunningham D, Sobrero A, et al. Cediranib with mFOLFOX6 versus bevacizumab with mFOLFOX6 as first-line treatment for patients with advanced colorectal cancer: a double-blind, randomized phase III study (HORIZON III). **J Clin Oncol** 2012; 30:3588-95.

Sclafani F, Rimassa L, Colombo P, et al. An exploratory biomarker study in metastatic tumors from colorectal cancer patients treated with bevacizumab. **Int J Biol Markers** 2015; 30:e73-80.

Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. **Genes Cancer** 2011; 2:1097-105.

Shindoh J, Loyer EM, Kopetz S, et al. Optimal morphologic response to preoperative chemotherapy: an alternate outcome end point before resection of hepatic colorectal metastases. **J Clin Oncol** 2012; 30:4566-72.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 2012; 62:10-29.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:5-29.

Simkens LH, Tol J, Terstappen LW, et al. The predictive and prognostic value of circulating endothelial cells in advanced colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy and bevacizumab. **Ann Oncol** 2010; 21:2447-8.

Smith NR, Baker D, James NH, et al. Vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. **Clin Cancer Res** 2010; 16:3548-61.

Stintzing S, Modest DP, von Weikersthal LF, et al. **Independent radiological evaluation of objective response rate, early tumour shrinkage, and depth of response in the FIRE-3 study: analysis in the final RAS evaluable population.** Available from: <URL:<https://www.webges.com/cslide/library/esmo/browse/itinerary/478/2014-09-29#9faw02SG>> [2015 12 fev].

Strickler JH, Hurwitz HI. Bevacizumab-based therapies in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. **Oncologist** 2012; 17:513-24.

Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:1100-8.

Suman S, Das TP, Ankem MK, et al. Targeting notch signaling in colorectal cancer. **Curr Colorectal Cancer Rep** 2014; 10:411-6.

Sun C, Zargham R, Shao Q, et al. Association of CD98, integrin β 1, integrin β 3 and Fak with the progression and liver metastases of colorectal cancer. **Pathol Res Pract** 2014; 210:668-74.

Sung CY, Son MW, Ahn TS, et al. Expression of placenta growth factor in colorectal carcinomas. **J Korean Soc Coloproctol** 2012; 28:315-20.

Tabernero J, Van Cutsem E, Lakomý R, et al. Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: prespecified subgroup analyses from the VELOUR trial. **Eur J Cancer** 2014; 50:320-31.

Tabernero J, Cohn AL, Obermannova R, et al. RAISE: A randomized, double-blind, multicenter phase III study of irinotecan, folinic acid, and 5-fluorouracil (FOLFIRI) plus ramucirumab (RAM) or placebo (PBO) in patients (pts) with metastatic colorectal carcinoma (CRC) progressive during or following first-line combination therapy with bevacizumab (bev), oxaliplatin (ox), and a fluoropyrimidine (fp). **J Clin Oncol** 2015; 33(suppl 3):A512. [Presented at 2015 ASCO Annual Meeting; 2015; may 29-Jun 2, Chicago-II].

Tai YL, Chen LC, Shen TL. Emerging roles of focal adhesion kinase in cancer. **Biomed Res Int** 2015; 2015:690690.

Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. **Cancer Res** 1995; 55:3964-8.

Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. **Nature** 2008; 454:656-60.

Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Sequencing of treatment in metastatic colorectal cancer: where to fit the target. **World J Gastroenterol** 2014; 20:1993-2004.

Theocharis SE, Kouraklis GP, Kakisis JD, et al. Focal adhesion kinase expression is not a prognostic predictor in colon adenocarcinoma patients. **Eur J Surg Oncol** 2003; 29:571-4.

Van Cutsem E, Rivera F, Berry S, et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. **Ann Oncol** 2009; 20:1842-7.

van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. **J Clin Oncol** 2012; 30:3499-506.

van der Wal GE, Gouw AS, Kamps JA, et al. Angiogenesis in synchronous and metachronous colorectal liver metastases: the liver as a permissive soil. **Ann Surg** 2012; 255:86-94.

Vassos N, Rau T, Merkel S, et al. Prognostic value of $\beta 1$ integrin expression in colorectal liver metastases. **Int J Clin Exp Pathol** 2013; 7:288-300.

Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz H-J, et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with KRAS wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC). **J Clin Oncol** 2014; 32 (suppl; abstr LBA3):5s. [Presented at 2014 ASCO Annual Meeting; 2014; may 30-Jun 3].

Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, et al. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin $\alpha 9\beta 1$. **J Biol Chem** 2005; 280:4544-52.

Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, et al. Integrin $\alpha 9\beta 1$ directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis. **J Biol Chem** 2007; 282:15187-96.

Vonlaufen A, Wiedle G, Borisch B, et al. Integrin alpha(v)beta(3) expression in colon carcinoma correlates with survival. **Mod Pathol** 2001; 14:1126-32.

Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, et al. Gene expression of vascular endothelial growth factor A, thymidylate synthase, and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in prediction of response to bevacizumab treatment in colorectal cancer patients. **Dis Colon Rectum** 2011; 54:1026-35.

Wei SC, Tsao PN, Yu SC, et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. **Gut** 2005; 54:666-72.

Weickhardt AJ, Williams D, Lee C, et al. Vascular endothelial growth factors (VEGF) and VEGF receptor expression as predictive biomarkers for benefit with bevacizumab in metastatic colorectal cancer (mCRC): analysis of the phase III MAX study. **J Clin Oncol** 2011; 29(4 suppl). [Presented at Gastrointestinal (Colorectal) Cancer: Colorectal Cancer Symposium. ASCO Chicago; 2011; Jan 20-22; San Francisco, California.

Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, et al. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. **Lancet** 1993; 342:1024-5.

Willet CG, Duda DG, di Tomaso E, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. **J Clin Oncol** 2009; 27:3020-6.

Withofs N, Signolle N, Somja J, et al. 18F-FPRGD2 PET/CT imaging of integrin $\alpha\beta3$ in renal carcinomas: correlation with histopathology. **J Nucl Med** 2015; 56:361-4.

Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, et al. New insights into the structural basis of integrin activation. **Blood** 2003; 102:1155-9.

Yan M, Plowman GD. Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. **Clin Cancer Res** 2007; 13:7243-6.

Yao J, Wu X, Zhuang G et al. Expression of a functional VEGFR-1 in tumor cells is a major determinant of anti-PlGF antibodies efficacy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:11590-5.

Yildiz R, Coskun U, Baglan T, et al. The relation between endoglin (CD105), thrombospondin-1 and VEGFR-3 and treatment results in metastatic colorectal cancer patients treated with Bevacizumab combination therapy. **Ann Oncol** 2010; 21(Suppl 8):A685. [Presented at Colorectal Cancer Symposium of the 35th ESMO Congress Milan, Italy 8-12 October 2010].

Zhang L, Chen J, Ke Y, et al. Expression of Placenta growth factor (PlGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance. **World J Surg Oncol** 2005; 3:68.

Zhang Y, Liu X, Zhang J, et al. The expression and clinical significance of PI3K, pAkt and VEGF in colon cancer. **Oncol Lett** 2012; 4:763-6.

Zhang Z, Ramirez NE, Yankeelov TE, et al. Alpha2 beta1 integrin expression in the tumor microenvironment enhances tumor angiogenesis in a tumor cell-specific manner. **Blood** 2008; 111:1980-8.

Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:35-49.

Zhong L, Yi XP, Li ZY, Faqian L. Phosphorylation and nuclear translocation of serine 722 and serine 910 of focal adhesion kinase in hypertrophic cardiac myocytes of left ventricle of spontaneously hypertensive rats. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi** 2008; 37:328-32.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 04 de Março de 2010.

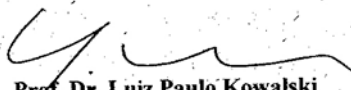
Ao
Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Ref.: Projeto de Pesquisa nº, 1134/08
"Correlação entre a expressão de integrinas e de proteínas envolvidas em neovascularização em tumores colorretais metastáticos e resposta ao tratamento com bevacizumabe".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 23/02/2010, tomaram conhecimento e aprovaram o seguinte documento:

- Solicitação de alteração do projeto de Departamental para Mestrado, pois o Dr. Tadeu Ferreira de Paiva Júnior é co-pesquisador do projeto e matriculou-se para mestrado nessa instituição em 2010.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Resumo de parte do trabalho apresentado em forma de poster no congresso da American Society of Clinical Oncology- ASCO em 2013

NOTCH1 as a potential prognostic biomarker for anti-VEGF therapy in patients with metastatic colorectal cancer.

Subcategory:

Cancer Angiogenesis and Metastases

Category:

Tumor Biology

Meeting:

2013 ASCO Annual Meeting

Session Type and Session Title:

General Poster Session, Tumor Biology

Abstract Number:

11038

Citation:

J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 11038)

Author(s):

Tadeu Ferreira Paiva, Alexandre Andre Balieiro Anastacio da Costa, Flavio Augusto Ismael Pinto, Victor Hugo Fonseca Jesus, Raul A. Marques, Patricia Peresi, Mariana Petaccia Macedo, Ludmilla T. D. Chinen, Benedito Mauro Rossi, Maria D. Begnami, Vladmir C. Lima; Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil; Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil

Abstracts that were granted an exception in accordance with ASCO's Conflict of Interest Policy are designated with a caret symbol (^).

Abstract Disclosures

Background: There are no validated biomarkers for clinical response or survival benefit in patients treated with bevacizumab (Bv) in advanced metastatic colorectal cancer (mCRC). The aim of this study was to evaluate the predictive value of putative biomarkers in mCRC. **Methods:** One hundred and five mCRC patients who received Bv combined with FOLFOX or FOLFIRI were retrospectively evaluated for clinical and pathological characteristics. VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PIGF, DLL4 and NOTCH1 expression were assessed by immunohistochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded neoplastic tissue of either primary or metastatic tissue in a tissue microarray. High levels of expression were defined as less than or equal to or more than the median. Survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test. For multivariate analysis the Cox proportional

hazards model was used. **Results:** Grade 1 or 2 (p=0.01), non-mucin-producing histology (p=0.04) and presence of liver metastasis (p=0.001) were associated with a higher response rate. There was no difference between the expression of markers and the response rate. ECOG 0 or 1 (p=0.002), grade 1 or 2 (p=0.02), liver metastasis (p=0.003), no lymph node metastasis (p=0.01) no peritoneal metastasis (p=0.02) and resection of metastasis (p<0.001) were correlated with higher progression-free survival (PFS). There was also a strong correlation between ECOG 0 or 1 (p=0.001), grade 1 or 2 (p=0.006), no lymph node metastasis (p=0.004), liver metastasis (p<0.001) and resection of metastasis (p<0.0001) with better overall survival. There was a trend between high expression of NOTCH1 (p=0.06) and worst PFS. High expression of VEGFR2 (p=0.07) was slightly associated with a better overall survival, while high expression of NOTCH1 was associated with a worse overall survival (p=0.01). Using multivariate analysis, NOTCH1 proved to be an independent variable for adverse overall survival (HR 2.01, IC 1.07 – 3.77, p=0.02). **Conclusions:** High NOTCH1 expression assessed by immunohistochemistry is capable of predicting poor survival in advanced colorectal cancer patients treated with bevacizumab.

Abstracts by T. F. Paiva:

1. [Safety profile of first-line bevacizumab and chemotherapy in patients with unresected primary colorectal cancer and synchronous metastases.](#)

Meeting: [2009 ASCO Annual Meeting](#) | Abstract No: e15133 | First Author: [C. Mello](#)

Category: [Gastrointestinal \(Colorectal\) Cancer - Colorectal Cancer](#)

1 **Anexo 3** - Artigo, com resultados parciais do trabalho, submetido a revista BMC
2 Cancer

3

4

5 **Angiogenesis-related protein expression in bevacizumab-treated**
6 **metastatic colorectal cancer: NOTCH1 detrimental to overall**
7 **survival**

8

9 Tadeu Ferreira Paiva Jr.¹, Victor Hugo Fonseca¹, Raul Amorim Marques¹, Alexandre
10 Balieiro¹, Mariana Petaccia², Patricia Peresi², Aline Damasceno³, Benedito Mauro
11 Rossi⁴, Maria Dirlei Begnami², Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima¹

12

13 ¹Department of Medical Oncology, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

14 ²Department of Pathology, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

15 ³Department of Statistics, Centro Internacional de Pesquisa e Ensino - Fundação
16 Antônio Prudente, São Paulo, Brazil

17 ⁴PhD/MSc Program, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil

18

19 **Short title:** NOTCH1 is a detrimental prognostic factor in bevacizumab-treated
20 metastatic colorectal patients

21

22 **Corresponding author:**

23 Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima, Department of Clinical Oncology, 1^o
24 Subsolo, Edifício Hilda Jacob R. Prof. Antônio Prudente, 211 ZC 01509-900, São
25 Paulo, Brazil.

26

27

28 **ABSTRACT**

29 **Background:** The development of targeted therapies has undoubtedly broadened
30 therapeutic options for patients with colorectal cancer (CRC). The use of
31 bevacizumab to reduce angiogenesis has been associated with improved clinical
32 outcomes. However, an urgent need for prognostic/predictive biomarkers for anti-
33 angiogenic therapies still exists.

34

35 **Methods:** Clinical data of 105 CRC patients treated with bevacizumab in
36 conjunction with chemotherapy were analyzed. The expression of vascular
37 endothelial growth factor (VEGF) receptors, NOTCH1 receptor and its ligand DLL4
38 were determined by immunohistochemistry. Tumor samples were arranged on a
39 tissue microarray. The association between protein expression and
40 clinicopathological characteristics and outcomes was determined.

41

42 **Results:** Bevacizumab was administered as a first-line of treatment in 70.5% of our
43 cases. The median progression-free survival (PFS) was 10.2 months. The median
44 overall survival (OS) of the total cohort was 24.4 months. Bevacizumab, as the first-
45 line of treatment, and the presence of liver metastasis were independently associated
46 with objective response rate. Membrane VEGFR1 and VEGFR3 expressions were
47 associated with the presence of lung metastasis; interestingly, VEGFR3 was
48 associated with less liver metastasis. NOTCH1 expression was associated with
49 lymph node metastasis. There was a trend toward association between improved PFS
50 and lower NOTCH1 expression ($p = 0.06$). Improved OS was significantly associated
51 with lower NOTCH1 expression ($p = 0.01$). In a multivariate analysis, ECOG
52 (Eastern Cooperative Oncology Group) performance status, liver metastasis,
53 histological grade, and NOTCH1 expression were independently associated with OS.

54

55 **Conclusion:** Our findings illustrated the expression profile of angiogenesis-related
56 proteins and their association with clinicopathological characteristics and outcomes.
57 NOTCH1 expression might be a detrimental prognostic factor in metastatic CRC
58 patients treated with chemotherapy plus bevacizumab.

59

60 **INTRODUCTION**

61 Colorectal cancer (CRC) is the fourth most common cause of death worldwide,
62 accounting for 694,000 deaths in 2012. CRC incidence is higher in men than in
63 women, being the third most common cancer in men and the second in women (1).
64 Almost 50% of patients will develop metastases and ~25% already have metastasis at
65 diagnosis (2). Although CRC incidence and mortality rates vary markedly around the
66 world, CRC is mainly a disease of developed Western countries. For 2015, it has
67 been estimated that the United States will have 132,700 new cases of CRC and
68 49,700 related deaths (3). In Brazil, 32,600 new cases of colorectal cancer were
69 expected in 2014 (4).

70 Angiogenesis induction is pivotal to tumor growth and metastases. From a molecular
71 perspective, angiogenesis is triggered by hypoxia, cytokines, oncogenes activating
72 mutations, growth factors and hormones that directly or indirectly promote the
73 production and release of an array of proteins genetically and functionally related to
74 VEGFA (vascular endothelial growth factor A). Subsequently, these proteins bind to
75 and activate specific membrane tyrosine-kinase receptors (VRGFR1, VEGFR2 and
76 VEGFR3) (5).

77 Similarly, a family of membrane bound receptors related to the protein NOTCH
78 (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 and NOTCH4) interact with membrane bound
79 ligands (JAGGED-1 or JAG1, JAG2, delta-like-1 or DLL1, DLL3 and DLL4) and
80 act to regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis, as well as
81 angiogenesis and tumor cell migration (6,7). Some data suggest that VEGFR2
82 activation by VEGFA upregulates DLL4 in tip cells. DDL4 in turn binds to and
83 activates NOTCH1 on stalk cells, reducing VEGFR2 expression and subsequently
84 increasing VEGFR1, thus constituting a negative feedback for the activity of
85 VEGFA (8).

86 In the last several years, the development of targeted therapies has provided
87 therapeutic options for patients with metastatic CRC in addition to improved clinical
88 outcomes. The median overall survival (OS) has increased by > 12 months since the
89 introduction of therapies using biological compounds and doublet/triplet
90 chemotherapy regimens (9). Bevacizumab (Avastin: Genentech, San Francisco, CA,
91 USA), a monoclonal antibody, is a potent inhibitor of vascular endothelial growth

92 factor (VEGF), and has been shown to reduce angiogenesis (10). The efficacy and
93 safety of bevacizumab have been demonstrated as both a first and second-line
94 treatment (11-13). In combination with chemotherapy, bevacizumab has been shown
95 to improve the overall response rate (RR), median progression-free survival (PFS)
96 and median OS (14). The majority of previously untreated metastatic CRC patients
97 are now treated with bevacizumab in combination with oxaliplatin and fluorouracil
98 (FOLFOX) (15). Furthermore, recent data have shown some clinical benefit in
99 maintaining VEGF inhibition with bevacizumab beyond disease progression (16).
100 Although significant improvements in outcome rates have been reported with various
101 anti-VEGF agents, a substantial number of patients do not obtain a pronounced
102 benefit which is most likely due to resistance mechanisms (17). DLL4-induced
103 Notch signaling, one of the mechanisms reported to mediate tumor resistance related
104 to anti-VEGF therapy, activates multiple parallel pathways and induces the formation
105 of large distorted vessels (8). The Notch signaling pathway has emerged as an
106 attractive target for angiogenesis-based cancer therapies (18). However, despite the
107 increasing role of various antiangiogenic drugs in personalized metastatic CRC care,
108 no biomarkers have been identified capable of predicting response to antiangiogenic
109 therapy. Several markers have been tested in preclinical models but failed as
110 predictors of response in human trials (19). Thus, there is an urgent need for
111 prognostic/predictive biomarkers for anti-VEGF therapies.

112 In this retrospective study, clinical features and outcomes in a cohort of 105 CRC
113 patients who received bevacizumab-containing regimens were reviewed and
114 presented. The expression of VEGF receptors, NOTCH1 receptor and its ligand
115 DLL4 in CRC tissues as well as the evaluation of their relationships with
116 clinicopathological characteristics and outcomes were determined retrospectively.
117 Importantly, this patient population was relatively homogeneous due to consistent
118 eligibility criteria, treatment guidelines, and evaluation parameters.

119

120 **METHODS**

121 *Patients and study design*

122 The medical data from CRC metastatic patients treated with a combination
123 of bevacizumab and chemotherapy were retrospectively analyzed. All data from May

124 2006 to November 2009 were obtained from chemotherapy registries from A.C.
125 Camargo Cancer Center - Fundação Antônio Prudente. A total of 151 patients were
126 found. Paraffin blocks were available for 117 patients, but in 11 of them the data or
127 material were not suitable for analysis, therefore, a total of 105 patients were eligible
128 for further study (Figure 1). The study was approved by the Ethics Committee of the
129 A.C. Camargo Cancer Center - Fundação Antônio Prudente (number 1134/08).

130 Demographic and clinical data were collected and included relevant medical history,
131 disease stage, tumor pathology at the initial diagnosis, details of chemotherapy
132 regimens used with bevacizumab, data concerning the primary surgery, and
133 metastasectomy. Tumors were staged according to the 7th edition of the TNM
134 classification of malignant tumors (20). Data for the response criteria and survival
135 outcomes were based on the chart review. Response criteria were evaluated
136 according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1 (RECIST
137 v1.1) (21). Cases treated before RECIST v1.1 publication were classified accordingly
138 based on data extracted from image reports. The PFS was defined as the time from
139 the beginning of bevacizumab treatment until the first observation of disease
140 progression. The OS was defined as the time from the beginning of bevacizumab
141 treatment until the date of either the last contact alive or death from any cause.
142 Hypertension was defined when blood pressure was either persistently elevated (>24
143 h) or repeated blood arterial pressure measurements were above 140 x 90 mmHg.
144 The Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.03 was
145 used to grade hypertension (22). Blood pressure values recorded by physicians and
146 nurses during screening consultations, pre-chemotherapy, and prior to initiation of
147 the antihypertensive treatment were analyzed. Archival pathological specimens were
148 collected, and the expression of the angiogenesis-related proteins was first verified
149 by immunohistochemistry and then quantified.

150

151 *Construction of tissue microarray blocks and immunohistochemistry analysis*

152 Archival formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were obtained from patients
153 who received bevacizumab. The chosen samples were from primary tumor and/or
154 metastatic tissue collected as close as possible to the start of bevacizumab treatment.
155 The paraffin blocks underwent tissue microarray construction before

156 immunostaining. In brief, a fresh section stained with hematoxylin and eosin was cut
157 from each block. The representative tumor areas were carefully selected and marked.
158 Using a tissue microarrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA), 1 mm
159 cylindrical cores were removed from each donor paraffin block and transferred to
160 premolded recipient paraffin blocks, in duplicates. Sections 5 μ m in thickness were
161 placed on glass slides. In the recipient block, cores were arrayed according to the
162 defined x-y coordinate position. Normal placenta tissue cores were used as a position
163 marker. Slides were then incubated with the primary antibodies according to the
164 manufacturer's protocol. The polyclonal antibodies used in this study were: PIGF
165 (1:20, R&D systems, Minneapolis, MN, USA), VEGFR2 (1:50, Neomarkers,
166 Fremont, CA, USA), VEGFR3 (1:400, LabVision, Fremont, CA, USA), and DLL4
167 (1:200, Abcam, Cambridge, UK). The monoclonal antibodies used were VEGFR1
168 (1:50, clone Y103, Abcam, Cambridge, UK) and NOTCH1 (1:50, Thermo Scientific,
169 clone A6, Rockford, IL, USA). Antibody detection was performed using a
170 streptavidin-biotin system (Biotinylated Link Universal, LSAB+, Carpinteria, CA,
171 USA) for PIGF and a biotin-free polymeric visualization system (Novolink Max
172 Polymer, Carpinteria, CA, USA) for all the other antibodies, according to the
173 manufacturers' protocol. Glass slides were digitalized using the Aperio Scan-Scope
174 XT Slide Scanner (Aperio Technologies, Vista, CA, USA) at 20x magnification. All
175 the tumoral areas in the tissue microarray (spots) were evaluated and scored
176 independently by the pathologist (M.M.P) and the oncologist (T.F.P.J.), without
177 previous knowledge of the clinicopathological outcomes of the patients. The
178 evaluation of the immunostaining was as follows: VEGFR1 (membrane and
179 cytoplasm), VEGFR2 (membrane and cytoplasm), VEGFR3 (membrane and
180 cytoplasm), PIGF in the cytoplasm, and DLL4 and NOTCH1 in the membrane. A
181 membrane staining algorithm (Membrane v1, Aperio, Vista, CA, USA) was used to
182 determine the intensity and extent of membrane staining. Tumor cells with weak or
183 partial membrane staining were scored 1+; tumor cells with moderate and complete
184 membrane staining were considered 2+; tumor cells with intense and complete
185 membrane staining were classified as 3+. For each TMA core, the percentage of cells
186 with score 0, +1, +2, +3 was registered. A positive staining was considered for cells
187 with scores 2+ and 3+, except for DLL4, where a score of 1+, 2+ and 3+ were

188 considered positive. The percentage of cells with positive staining in each TMA core
189 was summed up. The mean value per replicate was used for the statistical analysis. A
190 sample was considered non-representative when there were <500 analyzed cells. For
191 the quantification of stain in the cytoplasm, the Positive Pixel Count Algorithm
192 (Aperio, Vista, CA, USA) was used to sum the strongly and moderately positive
193 pixels in each core. The analyses included the classification of staining as strongly,
194 moderately and weakly positive, the number of negative cells, the analyzed area, and
195 the ratio of the number of positive/total number of cells. The mean value per
196 replicate was used for statistical analyses. A sample was considered non-
197 representative when there was an area <0.08 μm^2 (10% of the total core area).

198

199 *Statistical analysis*

200 Descriptive statistics was used for the analysis of demographic and clinical
201 characteristics. Frequencies and percentages were used for nominal/ordinal variables,
202 while median and range were used for continuous variables. The response rates
203 associated with demographic and clinical data were analyzed with the Chi-square and
204 Fisher's exact tests. Logistic regression was used to test the independent effect of
205 some variables on the objective response rate; all variables with $p \leq 0.05$ were
206 included in association tests. Correlations among angiogenesis-related proteins
207 employed a Pearson's correlation test. The survival curves were estimated using the
208 Kaplan-Meier method and were compared using the log-rank test. Patients who were
209 lost to follow-up were censored at the last contact date. Ordinal or nominal variables
210 were dichotomized by grouping. To analyze the association of OS and PFS with
211 angiogenesis-related protein expression, patients were subdivided into high- or low-
212 expression groups based on the median cut-off values. The Cox multivariate
213 regression model was used to test for independent significance of clinical and
214 pathological parameters on the OS.

215 All analyses were performed either with the R statistical software, version 2.3.0
216 (www.r-project.org) or SPSS v.17 statistical package (Chicago, IL, USA).

217

218 **RESULTS**

219 *Patient and tumor characteristics*

220 Median age at diagnosis was 56 years (range, 28-80 years); 58% of patients were
221 male, and 51% of patients presented one or more comorbidities. The most common
222 CRC localization was descending/sigmoid colon. Although all tumors were
223 adenocarcinomas, 9.6% presented mucinous histology (mucinous and mucin-
224 secreting) and 82.6% were moderately differentiated. By the time of diagnosis,
225 72.8% of patients had stage IV (synchronous metastases), the remaining patients
226 developed metachronous metastases (27.2%), the liver being the most common site
227 of metastasis. Ninety-five percent of patients underwent resection of the primary
228 tumor, and 58% underwent metastasis resection at some point. Tumor characteristics
229 are presented in Table 1.

230 Although most of the patients had an advanced stage of the disease at diagnosis,
231 96.9% presented an ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance
232 status of either 0 or 1. Bevacizumab was administered as the first, second, third, and
233 even the fourth line of therapy, with the majority of cases (70%) using it as the first-
234 line. Irinotecan plus 5-fluorouracil and leucovorin was the most common
235 chemotherapy drug regimen associated with bevacizumab (53.3%). Hypertension is a
236 common side effect of bevacizumab therapy. In our cohort, 25.8% of patients
237 experienced chemotherapy-related hypertension grade 2 or 3.

238

239 *Clinical outcomes*

240 In the total cohort of 105 patients, the median PFS was 10.2 months. There was a
241 significant association between PFS and ECOG 0 or 1 ($p = 0.002$), and PFS and
242 histological differentiation grades 1+ and 2+ ($p = 0.027$), shown in Figures 2A and
243 2B. Concerning the presence of metastasis, a longer PFS was significantly associated
244 with the presence of liver metastasis ($p = 0.003$, Figure 2C), absence of lymph node
245 metastasis ($p = 0.014$, Figure 2D), absence of peritoneal metastasis ($p = 0.023$,
246 Figure 2E), and with patients undergoing metastasis resection ($p < 0.001$, Figure 2F).
247 The median OS of the total cohort was 24.4 months (Figure 3A). There was a
248 significant association between better OS and ECOG 0 or 1 ($p = 0.01$, Figure 3B).
249 Improved OS was also associated with histological differentiation grades 1+ or 2+ (p
250 $= 0.006$, Figure 3C), presence of liver metastasis ($p < 0.001$, Figure 3D), absence of
251 lymph node metastasis ($p = 0.004$, Figure 3E), and with patients undergoing

252 metastasis resection ($p < 0.0001$, Figure 3F). Patients who underwent metastasis
253 resection at some point in the course of their disease had better OS (5-year survival
254 rate of 40%) as well as better PFS, with a 10-year survival rate of 18%.

255 Response rates were analyzed in 95 patients since nine patients did not present
256 detectable disease prior to bevacizumab treatment and one patient had no data
257 regarding response to treatment. Association with clinical variables is shown in
258 Table 2. Histological differentiation grades 1+ and 2+, non-mucinous histology, liver
259 metastasis and first-line therapy were significantly associated with better objective
260 response rates. In a multivariate logistic regression model for objective response the
261 included variables were line of bevacizumab treatment (first vs. others), combined
262 histology (mucin-secreting vs. non-mucin-secreting), histological differentiation
263 grade (1, 2 vs. 3) and the presence of liver metastasis (yes vs. no). Bevacizumab,
264 used in the first-line of treatment, and the presence of liver metastasis were
265 independently associated with objective response rate (Table 3).

266 We also evaluated ORR, PFS and OS from patients that received bevacizumab as a
267 first-line (N=73) and second-line treatment (N=29) separately. Demographics and
268 clinical characteristics of patients treated with bevacizumab as a firstline therapy are
269 shown in table S1 (supplementary online data). ORR, median PFS and median OS
270 was 59.7%, 10.6 months and 28.9 months in firstline and 36.0%, 8.2 months and
271 19.9 months in second-line, respectively (table S2 – supplementary online data).

272 Angiogenesis-related proteins were investigated by immunohistochemistry in
273 patients with the disease detected prior to bevacizumab treatment (Figure S1). The
274 proteins expressed most abundantly were VEGFR1 and NOTCH1. The expression
275 values for VEGFRs, PIGF, DLL4 and NOTCH1 are presented in Table 4. All of the
276 VEGF receptors 1, 2 and 3 had significant positive correlations among each other for
277 both membrane and cytoplasmic expression. All other significant correlations
278 involving PIGF, DLL4 and NOTCH1 are presented in Table 5.

279 The clinical characteristics significantly associated with angiogenesis-related
280 proteins are described in Table 6. DLL4 did not show any significant association
281 with clinical characteristics. There was no significant association between objective
282 response rate and the angiogenesis-related proteins investigated.

283 There was a trend toward an association between better PFS with lower NOTCH1
284 expression ($p = 0.06$, Figure 4A). Better OS was significantly associated with lower
285 NOTCH1 expression ($p = 0.01$, Figure 4B). To determine the variables
286 independently associated with OS, ECOG (0, 1 vs. 2, 3), metastasis resection (yes vs.
287 no), lymph node metastasis (yes vs. no), peritoneal metastasis (yes vs. no), liver
288 metastasis (yes vs. no), histological grade (1, 2 vs. 3), and NOTCH1 expression
289 (lower vs. higher) were included in a multivariate analysis shown in Table 7.

290

291 **DISCUSSION**

292 This retrospective analysis reports on the efficacy of bevacizumab administered
293 across multiple lines of treatment in a large cohort of patients from a reference center
294 in Brazil. We report the expression profile of angiogenesis-related proteins and their
295 association with clinical characteristics and outcomes.

296 Several phase III clinical trials have confirmed the efficacy of bevacizumab in
297 combination with FOLFOX or FOLFIRI in the first-line treatment for metastatic
298 CRC (11, 23). In 100 patients receiving, as the first-line therapy, bevacizumab with
299 irinotecan, 5-fluorouracil and leucovorin, a median PFS of 8.8 months was reported
300 compared to 6.8 months in the group without bevacizumab (11). Reported PFS in
301 this setting varied from 7 to 11 months (12, 23, 24). In our cohort of 105 patients,
302 70.0% received bevacizumab in the first-line treatment with the median PFS of 10.6
303 months. Although this cohort included a high proportion of patients with advanced
304 disease, our results are in line with reported data confirming the clinical value of
305 bevacizumab. As to be expected, a significantly better PFS was associated with
306 ECOG 0 or 1 and histological differentiation grades 1+ and 2+. Additionally, a better
307 PFS was significantly associated with the absence of extrahepatic metastasis and the
308 presence of liver metastasis, an outcome probably related to the high rate of
309 metastasis resection (58.1%). Our data showed a median OS of 24.4 months, in line
310 with the literature and associated with similar factors that were also related to a better
311 PFS, such as liver metastasis and metastasis resection (13, 23, 25, 26). Concerning
312 objective responses, better response rates were seen in histological differentiation
313 grades 1+ and 2+, non-mucinous histology, liver metastasis, and bevacizumab as the
314 first-line therapy. However, only the last two variables were independently

315 associated. Importantly, the objective response rate was 59% in patients who used
316 bevacizumab as the first-line therapy (67 patients in this analysis).

317 We analyzed the occurrence of hypertension, the most common side effect of
318 bevacizumab. Hypertension appears to be dose-dependent, and it is currently under
319 an investigation as a biomarker for VEGF inhibition efficacy (27, 28). Bevacizumab-
320 induced hypertension has been reported to be highly associated with improvements
321 in PFS, OS, and the overall RR (28). In our study, hypertension grades 2 and 3 were
322 present in 25.8% of patients. Grade 3 hypertension was present in 13.9%, in line with
323 previously reported data (29). However, we did not identify a significant association
324 between the presence of hypertension and objective response rate. No significant
325 association was seen between outcomes or expression of angiogenesis-related
326 proteins and hypertension.

327 Although outcome results may vary, the use of bevacizumab therapy has been well
328 established (26, 30). However, the heterogeneity of results shown in several clinical
329 trials demonstrates an urgent need for biomarkers predicting bevacizumab treatment
330 outcome and toxicity. Different biomarkers such as mutations of *BRAF* and *KRAS*
331 (31), microvessel density and VEGF levels (32) have been studied, but no predictive
332 factors have been identified. Biomarkers would allow for the selection of patients
333 most prone to respond to antiangiogenic therapy. In this cohort, the most expressed
334 angiogenesis-related proteins were VEGFR1 and NOTCH1 with a median value of ~
335 65% positive cells.

336 PlGF is a VEGF homolog and a ligand for VEGFR1 that acts by amplifying the
337 responsiveness of VEGFR1 to VEGF during pathological angiogenesis (33).
338 NOTCH1 signaling activation has been shown to induce VEGFR1 expression (34)
339 and enhance its responsiveness to PlGF (35). In line with this, we found significant
340 positive correlations between the expression of VEGFR1 (membrane and cytoplasm)
341 and PlGF, as well as between VEGFR1 (membrane and cytoplasm) and NOTCH1,
342 and NOTCH1 and PlGF. However, although there is a negative NOTCH1 signaling
343 feedback to VEGFR2, resulting in decreased endothelial cells proliferation in
344 response to VEGF (36), there was no significant correlation between the expression
345 of NOTCH1 or DLL4 and VEGFR2. While bevacizumab treatment has been
346 associated with increased levels of PlGF (37), its value as a biomarker remains

347 largely unknown. Instead of contributing to tumor escape and resistance, as has been
348 suggested, increased PIGF expression might only be a host response elicited by
349 angiogenic therapies (38) since it has been associated with better outcomes in
350 glioblastoma (39).

351 We also analyzed the association of angiogenesis-related protein expressions with
352 clinical and pathological characteristics. In tumors or plasma, VEGFR1 is a strong
353 biomarker candidate to predict response to bevacizumab (40). The median expression
354 of VEGFR1 was twice that of VEGFR2 in our cohort, and higher expression of
355 membrane VEGFR1 was associated with lung metastasis. In the MAX III trial
356 (testing the combination of capecitabine, bevacizumab and mitomycin), the authors
357 observed an association between low VEGFR1 expression by immunohistochemistry
358 on tumors and improved OS (40).

359 VEGFR3 is a major inducer of lymphangiogenic signaling, but its expression has
360 been associated with the presence of hematogenous metastasis (41) and poor OS
361 (42). In our cohort, while higher expression of membrane and cytoplasmic VEGFR3
362 was associated with lung metastasis, lower expression was associated with liver
363 metastasis. YILDIZ et al. (2010) evaluated the expression of VEGFR3 by
364 immunohistochemistry in tumor samples from metastatic colorectal cancer patients
365 treated with chemotherapy and bevacizumab and observed positive expression in
366 20% of cases. The authors did not identify any association with efficacy outcomes
367 (45).

368 Increased NOTCH1 expression was associated with lymph node metastasis, which is
369 in line with previously reported data (43, 44).

370 PFS was not significantly associated with any of the angiogenesis-related proteins.
371 We saw a trend toward longer PFS in patients whose tumors bore lower expression
372 of NOTCH1, most likely because NOTCH1 expression might be involved in tumor
373 resistance to bevacizumab. Angiogenesis induced by DLL4-NOTCH1 signaling
374 generates large vessels that increase tumor blood supply and diminish sensitivity to
375 bevacizumab (17). Besides, lower expression of NOTCH1 was significantly
376 associated with better OS. NOTCH1 activation induces VEGFR3 (6), and it has
377 already been associated with poor survival (43). In multivariate analysis, the only
378 factors that were independently associated with PFS were histological grade and

379 metastasis resection. For OS, NOTCH1 remained an independent variable,
380 confirming the reported association between overactivated NOTCH signaling and
381 poor survival in CRC (43). CHU et al. described that, among 1003 tumor samples
382 from early stage resected colorectal cancer, 52.1% of cases were positive for
383 NOTCH1 and 33.4% for NOTCH2 by immunohistochemistry. Patients bearing
384 NOTCH1 positive tumors had worse OS (38 months vs 66 months for NOTCH1
385 negative cases). The opposite results were observed in association with NOTCH2
386 expression, where low NOTCH2 was associated with worse OS (46). Similarly, we
387 also found that NOTCH1 hyperexpression is associated with reduced OS, however
388 differently from the study by CHU et al. (47, 48), our cohort is composed solely of
389 metastatic colorectal cancer patients treated with chemotherapy plus bevacizumab.
390 Although, we can not draw conclusions on the predictive capacity of NOTCH1, we
391 believe it is definitely prognostic, and, to our knowledge, this is the first published
392 report showing this association in this population.

393 In summary, the results of this retrospective study are similar to the outcomes
394 observed in large clinical trials confirming the effectiveness of bevacizumab in
395 common daily practice. The expression profile of angiogenesis-related proteins and
396 their association with clinicopathological characteristics and outcomes were
397 described, building on the current understanding of the role of these proteins in the
398 setting of chemotherapy in addition to bevacizumab therapy. Our results suggest that
399 NOTCH1 might serve as a prognostic marker for colorectal cancer in the metastatic
400 setting.

401

402 **CONCLUSION**

403 We evaluated the expression of proteins involved with angiogenesis in colorectal
404 tumor samples from patients receiving bevacizumab in conjunction with
405 chemotherapy. High expression levels of VEGFR1 and VEGFR3 were associated
406 with a higher rate of lung metastasis. VEGFR3 expression was also associated with
407 liver metastasis. NOTCH1 expression was associated with an increased risk of lymph
408 node metastasis and a worse overall survival.

409

410 **FUNDING**

411 This study was funded by the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
412 de São Paulo - number 2010/07858-2).

413

414 **COMPETING INTERESTS**

415 The authors declare that they have no competing interests.

416

417 **AUTHOR'S CONTRIBUTION**

418 TFPJr: was responsible for the collection and the quality of clinical data, had full
419 access to all data, and performed the data analysis. VCCL: was the project leader and
420 designed the study, had full access to all data, performed the data analysis and
421 drafted all the versions of the manuscript. MDB: was the leader pathologist, helped
422 to design the study, made a critical review and proofread of the document. AD, AB:
423 were responsible for the statistical analysis, made a critical review and proofread of
424 the document. BMR: participated in the study design, made a critical review and
425 proofread of the document. MP, PP: helped in all pathological analysis, made a
426 critical review and proofread of the document. VHF, RAM: were responsible for the
427 collection of the clinical data and provided comments on the drafts. All the authors:
428 read and approved the final version of the manuscript.

429

430 **ACKNOWLEDGEMENTS**

431 The authors take full responsibility for the content of this publication. We thank the
432 Expertix Medical Communications, funded by Produtos Roche Químicos e
433 Farmacêuticos SA for providing writing and editing support. Produtos Roche
434 Químicos e Farmacêuticos SA did not influence the content of the report, nor did the
435 authors receive any financial compensation for authoring the report.

436

437

438 **REFERENCES**

- 439 1. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM,
440 Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality
441 Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International
442 Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>,
443 accessed on 08/04/2014.
- 444 2. Van Cutsem E, Oliveira J, Group EGW. Advanced colorectal cancer: ESMO
445 clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of
446 oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.*
447 2009 May; 20 Suppl 4:61-3. PubMed PMID: 19454465.
- 448 3. [Siegel RL](#), [Miller KD](#), [Jemal A](#). Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.*
449 2015 Jan-Feb;65(1):5-29. PMID: 25559415.
- 450 4. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>
- 451 5. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358(19):2039-49.
452 PMID: 18463380.
- 453 6. Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid
454 tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:338-
455 51. PMID: 21508972.
- 456 7. Suman S, Das TP, Ankem MK, [Damodaran C](#). Targeting Notch Signaling in
457 Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2014 Dec 1;10(4):411-416. PMID:
458 25395896.
- 459 8. Li JL, Sainson RC, Oon CE, Turley H, Leek R, Sheldon H, et al. DLL4-
460 Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer
461 research.* 2011 Sep 15;71(18):6073-83. PubMed PMID: 21803743.
- 462 9. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Sequencing of treatment in
463 metastatic colorectal cancer: Where to fit the target. *World journal of
464 gastroenterology : WJG.* 2014 Feb 28;20(8):1993-2004. PubMed PMID: 24616571.
465 Pubmed Central PMCID: 3934469.
- 466 10. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of
467 bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical
468 studies. *Cancer research.* 2005 Feb 1;65(3):671-80. PubMed PMID: 15705858.

- 469 11. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figuer A, Wong R, et al.
470 Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line
471 therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of*
472 *clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.*
473 2008 Apr 20;26(12):2013-9. PubMed PMID: 18421054.
- 474 12. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E,
475 et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active
476 regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology :*
477 *official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2005 May
478 20;23(15):3502-8. PubMed PMID: 15908660.
- 479 13. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts
480 SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin
481 (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the
482 Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of clinical oncology :*
483 *official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2007 Apr
484 20;25(12):1539-44. PubMed PMID: 17442997.
- 485 14. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF,
486 Lieberman G, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus
487 fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic
488 colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American*
489 *Society of Clinical Oncology.* 2003 Jan 1;21(1):60-5. PubMed PMID: 12506171.
- 490 15. Politano S, Overman M, Pathak P, Chadha R, Glover K, Chang DZ, et al.
491 Second-line chemotherapy use in metastatic colon cancer varies by disease
492 responsiveness. *Clinical colorectal cancer.* 2008 Jan;7(1):55-9. PubMed PMID:
493 18279578.
- 494 16. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Osterlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al.
495 Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer
496 (ML18147): a randomised phase 3 trial. *The lancet oncology.* 2013 Jan;14(1):29-37.
497 PubMed PMID: 23168366.
- 498 17. Ellis LM, Hicklin DJ. Pathways mediating resistance to vascular endothelial
499 growth factor-targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the*

500 American Association for Cancer Research. 2008 Oct 15;14(20):6371-5. PubMed
501 PMID: 18927275.

502 18. Zhang Y, Li B, Ji ZZ, Zheng PS. Notch1 regulates the growth of human
503 colon cancers. *Cancer*. 2010 Nov 15;116(22):5207-18. PubMed PMID: 20665495.

504 19. Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of
505 bevacizumab in cancer. *The lancet oncology*. 2010 Dec;11(12):1172-83. PubMed
506 PMID: 21126687.

507 20. Edge S, Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A.
508 AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual. 7th ed.
509 ed2010.

510 21. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et
511 al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline
512 (version 1.1). *European journal of cancer*. 2009 Jan;45(2):228-47. PubMed PMID:
513 19097774.

514 22. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events
515 (CTCAE) v.4.03 Accessed at: . Available from:
516 evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf.

517 23. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, et al.
518 Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral
519 fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from
520 the BICC-C Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American*
521 *Society of Clinical Oncology*. 2007 Oct 20;25(30):4779-86. PubMed PMID:
522 17947725.

523 24. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim
524 W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic
525 colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004 Jun 3;350(23):2335-
526 42. PubMed PMID: 15175435.

527 25. Hochster HS, Hart LL, Ramanathan RK, Childs BH, Hainsworth JD, Cohn
528 AL, et al. Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or
529 without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of
530 the TREE Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American*

531 Society of Clinical Oncology. 2008 Jul 20;26(21):3523-9. PubMed PMID:
532 18640933.

533 26. Fourrier-Reglat A, Smith D, Rouyer M, Benichou J, Guimbaud R, Becouarn
534 Y, et al. Survival outcomes of bevacizumab in first-line metastatic colorectal cancer
535 in a real-life setting: results of the ETNA cohort. Targeted oncology. 2013 Dec 5.
536 PubMed PMID: 24307007.

537 27. Gampenrieder SP, Romeder F, Muss C, Pircher M, Ressler S, Rinnerthaler G,
538 et al. Hypertension as a predictive marker for bevacizumab in metastatic breast
539 cancer: results from a retrospective matched-pair analysis. Anticancer research. 2014
540 Jan;34(1):227-33. PubMed PMID: 24403467.

541 28. Cai J, Ma H, Huang F, Zhu D, Bi J, Ke Y, et al. Correlation of bevacizumab-
542 induced hypertension and outcomes of metastatic colorectal cancer patients treated
543 with bevacizumab: a systematic review and meta-analysis. World journal of surgical
544 oncology. 2013;11:306. PubMed PMID: 24283603.

545 29. Escalante CP, Zalpour A. Vascular endothelial growth factor inhibitor-
546 induced hypertension: basics for primary care providers. Cardiology research and
547 practice. 2011;2011:816897. PubMed PMID: 21629798. Pubmed Central PMCID:
548 3099203.

549 30. Meyerhardt JA, Li L, Sanoff HK, Carpenter Wt, Schrag D. Effectiveness of
550 bevacizumab with first-line combination chemotherapy for Medicare patients with
551 stage IV colorectal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the
552 American Society of Clinical Oncology. 2012 Feb 20;30(6):608-15. PubMed PMID:
553 22253466. Pubmed Central PMCID: 3295559.

554 31. Selcukbiricik F, Erdamar S, Ozkurt CU, Molinas Mandel N, Demirelli F,
555 Ozguroglu M, et al. The role of K-RAS and B-RAF mutations as biomarkers in
556 metastatic colorectal cancer. Journal of BUON : official journal of the Balkan Union
557 of Oncology. 2013 Jan-Mar;18(1):116-23. PubMed PMID: 23613396.

558 32. Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, Holmgren EB, Tobin P, Guerrero AS, et al.
559 Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2
560 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in
561 metastatic colorectal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the

562 American Society of Clinical Oncology. 2006 Jan 10;24(2):217-27. PubMed PMID:
563 16365183.

564 33. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et
565 al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor
566 contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions.
567 Nature medicine. 2001 May;7(5):575-83. PubMed PMID: 11329059.

568 34. Outtz HH, Wu JK, Wang X, Kitajewski J. Notch1 deficiency results in
569 decreased inflammation during wound healing and regulates vascular endothelial
570 growth factor receptor-1 and inflammatory cytokine expression in macrophages.
571 Journal of immunology. 2010 Oct 1;185(7):4363-73. PubMed PMID: 20739676.
572 Pubmed Central PMCID: 3887523.

573 35. Funahashi Y, Shawber CJ, Vorontchikhina M, Sharma A, Outtz HH,
574 Kitajewski J. Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1.
575 Journal of angiogenesis research. 2010;2(1):3. PubMed PMID: 20298529. Pubmed
576 Central PMCID: 2828996.

577 36. Taylor KL, Henderson AM, Hughes CC. Notch activation during endothelial
578 cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1
579 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. Microvascular research. 2002
580 Nov;64(3):372-83. PubMed PMID: 12453432.

581 37. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, Boucher Y, Ancukiewicz M, Sahani
582 DV, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation
583 therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. Journal
584 of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.
585 2009 Jun 20;27(18):3020-6. PubMed PMID: 19470921. Pubmed Central PMCID:
586 2702234.

587 38. Bagley RG, Ren Y, Weber W, Yao M, Kurtzberg L, Pinckney J, et al.
588 Placental growth factor upregulation is a host response to antiangiogenic therapy.
589 Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer
590 Research. 2011 Mar 1;17(5):976-88. PubMed PMID: 21343374.

591 39. Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner
592 E, et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor
593 receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. Journal of

594 clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.
595 2010 Jun 10;28(17):2817-23. PubMed PMID: 20458050. Pubmed Central PMCID:
596 2903316.

597 40. Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, Carmeliet P, Scherer SJ. Markers of
598 response for the antiangiogenic agent bevacizumab. Journal of clinical oncology :
599 official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013 Mar
600 20;31(9):1219-30. PubMed PMID: 23401453.

601 41. Jayasinghe C, Simiantonaki N, Michel-Schmidt R, Kirkpatrick CJ.
602 Endothelial VEGFR-3 expression in colorectal carcinomas is associated with
603 hematogenous metastasis. Oncology reports. 2009 Nov;22(5):1093-100. PubMed
604 PMID: 19787226.

605 42. Martins SF, Garcia EA, Luz MA, Pardal F, Rodrigues M, Filho AL.
606 Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C,
607 VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer. Cancer genomics &
608 proteomics. 2013 Mar-Apr;10(2):55-67. PubMed PMID: 23603341.

609 43. Chu D, Li Y, Wang W, Zhao Q, Li J, Lu Y, et al. High level of Notch1
610 protein is associated with poor overall survival in colorectal cancer. Annals of
611 surgical oncology. 2010 May;17(5):1337-42. PubMed PMID: 20058190.

612 44. Park HS, Jung CK, Lee SH, Chae BJ, Lim DJ, Park WC, et al. Notch1
613 receptor as a marker of lymph node metastases in papillary thyroid cancer. Cancer
614 science. 2012 Feb;103(2):305-9. PubMed PMID: 22118425.

615 45. Yildiz R, Coskun U, Baglan T, et al. The relation between endoglin (CD105),
616 thrombospondin-1 and VEGFR-3 and treatment results in metastatic colorectal
617 cancer patients treated with Bevacizumab combination therapy. **Ann Oncol** 2010;
618 21(Suppl 8):A685. [Presented at Colorectal Cancer Symposium of the 35th ESMO
619 Congress Milan, Italy 8-12 October 2010].

620 46. Shawber CJ, Funahashi Y, Francisco E, Vorontchikhina M, Kitamura Y,
621 Stowell SA, et al. Notch alters VEGF responsiveness in human and murine
622 endothelial cells by direct regulation of VEGFR-3 expression. The Journal of clinical
623 investigation. 2007 Nov;117(11):3369-82. PubMed PMID: 17948123. Pubmed
624 Central PMCID: 2030453.

625 47. Chu D, Zhang Z, Zhou Y, Wang W, Li Y, Zhang H, et al. Notch1 and Notch2
626 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Ann Oncol* 2011;
627 22:2440-7. PubMed PMID: 21378202.

628 48. Chu D, Zhou Y, Zhang Z, Li Y, Zheng J, Zhang H, et al. Notch1 expression,
629 which is related to p53 Status, is an independent predictor of prognosis in colorectal
630 cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(17):5686-94. PubMed PMID: 21771876.

631

632

633

634

635 **FIGURE LEGENDS**

636

637 **Figure 1.** Flow diagram for patient selection.

638

639 **Figure 2.** The progression-free survival curves according to: ECOG (1 = ECOG 0, 1
640 vs. 2 = ECOG 2, 3), $p = 0.002$ (**A**); histological grade (well differentiated = grade 1,
641 moderately differentiated = grade 2 vs. poorly differentiated = grade 3), $p = 0.0027$
642 (**B**); with liver metastasis (yes vs. no), $p = 0.003$ (**C**); lymph node metastasis (yes vs.
643 no), $p = 0.014$ (**D**); peritoneal metastasis (yes vs. no), $p = 0.023$ (**E**), and patients who
644 underwent metastasis resection (yes vs. no), $p < 0.001$ (**F**). The survival curves were
645 calculated using the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used for
646 comparison.

647 ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group performance status score.

648

649 **Figure 3.** The overall survival curves from the start of bevacizumab treatment.
650 Overall survival curve from the total cohort (n = 105 patients), median of 24.4
651 months (**A**). Overall survival curves according to: ECOG (1 = ECOG 0, 1 vs. 2 =
652 ECOG 2, 3), $p = 0.001$ (**B**); histological grade (well differentiated= grade 1,
653 moderately differentiated= grade 2 vs. poorly differentiated= grade 3), $p = 0.006$ (**C**);
654 liver metastasis (yes vs. no), $p < 0.001$ (**D**); lymph node metastasis (yes vs. no), $p =$
655 0.004 (**E**), and patients who underwent metastasis resection (yes vs. no), $p < 0.001$
656 (**F**). The survival curves were calculated using the Kaplan-Meier method, and the
657 log-rank test was used for comparison.

658 ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group performance status score.

659

660 **Figure 4.** The progression-free survival curve for NOTCH1 expression, $p = 0.06$ (**A**),
661 and the overall survival for NOTCH1, $p = 0.01$ (**B**). Low expression: < median
662 expression value vs. high expression: \geq median expression value. The survival curves
663 were calculated using the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used for
664 comparison.

665

666 **Table 1.** Tumor characteristics.

Characteristics	Frequency
Localization (n = 104)	
Descending / sigmoid colon	57.7%
Medium and lower rectum	22.1%
Ascending colon	17.3%
Transverse colon	2.9%
Histology (n = 104)	
Adenocarcinoma NOS	50.0%
Tubular adenocarcinoma	39.4%
Mucin-secreting adenocarcinoma	4.8%
Mucinous adenocarcinoma	3.8%
Signet ring cell carcinoma	1.0%
Cribriform adenocarcinoma	1.0%
Histologic differentiation (n = 92)	
Well (1)	6.5%
Moderate (2)	82.6%
Poor (3)	10.9%
Blood vessel invasion (n = 81)	
Yes	16.0%
No	84%
Lymphatic invasion (n = 80)	
Yes	36.3%
No	63.7%
Perineural invasion (n = 78)	
Yes	30.8%
No	60.2%
Depth of tumor invasion (n = 98)	
T1	2.0%
T2	6.1%
T3	75.5%

T4	15.3%
Tx	1.0%
Lymph node metastasis (n= 98)	
N0	30.6%
N1	32.7%
N2	35.7%
Nx	1.0%
Metastasis (M1) at diagnosis (n =104)	
Yes	72.8%
No	27.2%
TNM staging at diagnosis (n =103)	
I	1.0%
II	11.7%
III	14.6%
IV	72.8%
Metastatic sites (n = 105)	
Liver	65.7%
Lymph nodes	25.7%
Lung	33.3%
Peritoneum	17.1%
Skin / subcutaneous	1.0%
Locoregional recidive	11.5%
Metastasis resection (n = 105)	
Yes	58.1%
No	41.9%

667 n: number of patients with available data in each category. Tumors were staged
668 according to the 7th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors. NOS:
669 not otherwise specified.

670

671 **Table 2.** Association between clinical variables and objective response by RECIST.

Variable		Total n	CR+PR n (%)	SD+PD n (%)	<i>p value</i>
Grade	1+2	74	42 (57)	32 (43)	0.01
	3	9	1 (11)	8 (89)	
Mucinous histology	no	84	46 (55)	38 (45)	0.048
	yes	10	2 (20)	8 (80)	
Liver metastasis	no	31	8 (26)	23 (74)	0.001
	yes	64	40 (62)	24 (38)	
Peritoneal metastasis	no	79	43 (54)	36 (46)	0.09
	yes	16	5 (31)	11 (69)	
Chemotherapy	FOLFIRI	52	25 (48)	27 (52)	0.43
	FOLFOX	39	22 (56)	17 (44)	
Hypertension	no	61	29 (47)	32 (53)	0.41
	yes	30	17 (57)	13 (43)	
Chemo+bevacizumab as first-line therapy [#]	no	28	9 (36)	19 (64)	0.02
	yes	67	40 (60)	27 (40)	

672

673 RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; FOLFIRI: infusional 5-
674 fluoro-uracyl plus leucovorin plus irinotecan; FOLFOX: infusional 5-fluoro-uracyl
675 plus leucovorin plus oxaliplatin; CR: Complete Response; PR: Partial Response; SD:
676 Stable Disease; PD: Progressive Disease (PD). Data are number of patients and
677 numbers in parentheses are percentages. [#] Chemo: chemotherapy

678 **Table 3.** Multivariate logistic regression analysis showing the variables
 679 independently associated with objective response rate (n = 83 patients).

Covariates	Odds ratio	CI 95%	<i>p value</i>
Chemo+bevacizumab [#]			
First-line vs. others	3.65	1.03-12.87	0.032
Liver metastasis			
yes vs. no	4.12	1.18-14.29	0.027
Histological grade			
G1, 2 vs. G3	9.78	0.97-98.98	0.059
Histology			
Mucin-secreting vs. non-mucin-secreting	0.47	0.03 – 6.18	0.56

680 CI: Confidence interval. [#] Chemo: chemotherapy

681

682 **Table 4.** Expression of angiogenesis-related proteins in the total cohort.

683

Angiogenesis-related protein	n	% of positive cells/core (median)	Range (%)
VEGFR1			
membrane	96	64.5	1 – 76
cytoplasm	96	60.4	0 - 86.7
VEGFR2			
membrane	96	9.5	0 – 64
cytoplasm	92	22	0.35 – 72.8
VEGFR3			
membrane	96	17	0 – 67
cytoplasm	94	26.3	2.06 – 80.1
PlGF	93	38.9	0.44 – 83.1
DELL4	92	27	1 – 99
NOTCH1	96	69	6 – 79

684

685

686 **Table 5.** Correlations between angiogenesis-related proteins.

Angiogenesis-related proteins	Correlation coefficient	<i>p</i>
PlGF and membrane VEGFR1	0.50	<0.0001
PlGF and cytoplasm VEGFR1	0.58	<0.0001
PlGF and cytoplasm VEGFR2	0.23	<0.0001
DELL4 and membrane VEGFR1	0.28	0.0243
DELL4 and cytoplasm VEGFR1	0.28	0.0056
DELL4 and PLGF	0.24	0.0172
DELL4 and NOTCH1	0.25	0.0161
NOTCH1 and membrane VEGFR1	0.56	<0.0001
NOTCH1 and cytoplasm VEGFR1	0.34	<0.0001
NOTCH1 and PlGF	0.27	0.0072

687

688

689 **Table 6.** Association between expression of angiogenesis-related proteins and
 690 clinical characteristics.

691

	Characteristic	<i>p</i>
692		
693	VEGFR1	
694	membrane	Lung metastasis 0.002
695	cytoplasm	Stage I and II 0.03
696	VEGFR2	
697	cytoplasm	Stage I and II 0.03
698	VEGFR3	
699	membrane	Lung metastasis 0.001
700		Liver metastasis 0.03
701		
702	cytoplasm	Lung metastasis 0.003
703	PlGF	Stages I and II 0.04
	NOTCH1	Metastasis to regional lymph nodes (N1 or N2) 0.04

704 **Table 7.** Multivariate regression analysis for overall survival (OS). Eighty-eight
 705 patients with complete data were included in this analysis.

706

Covariates	HR	CI 95%	<i>p</i>
Liver metastasis (yes vs. no)	1.93	1.09 – 3.44	0.024
Histological grade (1+2 vs. 3)	2.79	1.16 – 6.68	0.021
ECOG (0+1 vs. 2+3)	20.50	3.08 – 136.11	0.002
NOTCH1	2.01	1.07 – 3.77	0.029

707

708

709

710

711

712

713

714

715 HR: Hazard ratio; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group performance
 716 status score; CI: Confidence interval.

717

718 **SUPPLEMENTARY ONLINE DATA**

719 **Figure S1.** Microphotographs displaying the pattern of immunohistochemical protein
 720 expression observed for each studied protein. For each marker, a positive and a
 721 negative case is shown. **A)** and **B)** VEGFR1; **C)** and **D)** VEGFR2; **E)** and **F)**
 722 VEGFR3; **G)** and **H)** PLGF; **I)** and **K)** NOTCH1, and **L)** and **M)** DLL4.

723

724 **Table S1** - Demographic and clinical characteristics of patients receiving
 725 chemotherapy plus bevacizumab as first-line treatment (N=73).

Variable (N=number of patients with available data)	
Age (years)	

Median	57 (28-80)
Gender (N= 73)	
Male	56%
Female	44%
Tumor location (N= 73)	
Left colon	82%
Descending / sigmoid / upper rectum	59%
Medium and lower rectum	23%
Right colon	18%
Ascending	15%
Transverse	3%
Histology (N= 72)	
Adenocarcinoma NOS	47%
Tubular adenocarcinoma	47%
Mucin-secreting adenocarcinoma	3%
Mucinous adenocarcinoma	3%
Signet ring cell adenocarcinoma	0%
Cribriform adenocarcinoma	0%
Histological grade (N= 66)	
1	6%
2	86%
3	8%
Stage at diagnosis (N=72)	
I	0%
II	15%
III	13%
IV	72%
Sites of metastatic disease (N= 73)	
Liver	68%
Lung	27%

Lymph node	22%
Peritoneum	19%
Locoregional relapse	10%
Resection of the primary tumor (N= 73)	
Yes	96%
No	4%
Neoadjuvant radiotherapy (N= 73)	
Yes	20%
No	80
Neoadjuvant chemotherapy (N= 73)	
Yes	19%
No	81%
Adjuvant chemotherapy* (N= 73)	
Yes	23%
No	85%
Adjuvant chemotherapy protocol (N=17)	
FOLFOX / FLOX	71%
5-FU / Capecitabine	24%
Resection of metastatic disease (N= 73)	
Yes	57%
No	43%
ECOG[#] (N= 70)	
0	76%
1	23%
2	0%
3	1%
Measurable disease at bevacizumab start time (N= 73)	
Yes	92%
No	8%
Chemotherapy protocol given with bevacizumab (N= 73)	
FOLFOX	56%
FOLFIRI	41%

IROX	3%
Number of chemotherapy cycles	
Median	12 (2-21)
Number of bevacizumab cycles	
Median	11 (2-21)
Bevacizumab schedule (N=73)	
5mg/Kg biweekly	99%
7.5mg/Kg monthly	1%
Arterial hypertension (N= 70)	
0	69%
1	4%
2	13%
3	14%
4	0%
KRAS exon 2 mutation (N=58)	35%

726 NOS: not otherwise specified. * Seventeen patients received adjuvant chemotherapy
727 at the time of primary tumor diagnosis. # ECOG was evaluated at the time of
728 bevacizumab initiation.

729

730 **Table S2.** Data regarding efficacy outcomes according to line of treatment. Table
731 depicts overall response rate (ORR), PFS (progression free survival) and overall
732 survival (OS) of patients treated with chemotherapy plus bevacizumab in first-line in
733 comparison to second-line.

Outcomes	First line	Second line
ORR	59.7%	36.0%
PFS	10.6 months	8.2 months
OS	28.9 months	19.9 months

734

Anti-VEGF Receptor 1 antibody [Y103] ab32152



★★★★★ 13 Abreviews | 28 References | 5 Images

Overview

Product name	Anti-VEGF Receptor 1 antibody [Y103]
Description	Rabbit monoclonal [Y103] to VEGF Receptor 1
Specificity	ab32152 recognises VEGF receptor 1 and its splice isoform sFlt1.
Tested applications	WB, IHC-P, ICC/IF, IP, Flow Cyt, IHC-Fr
Species reactivity	Reacts with: Mouse, Rat, Human
Immunogen	Synthetic peptide corresponding to residues in N terminus of human VEGF Receptor 1
Positive control	Mouse brain tissue, A431 cells, skin cancer.
General notes	Produced using Abcam's RabMab [®] technology. RabMab [®] technology is covered by the following U.S. Patents, No. 5,675,063 and/or 7,429,487. This product is available conjugated to DyLight [®] 488 see ab139829 .

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Upon delivery aliquot and store at -20°C. Avoid freeze / thaw cycles.
Storage buffer	PBS 49%, Sodium azide 0.01%, Glycerol 50%, BSA 0.05%
Purity	IgG fraction
Clonality	Monoclonal
Clone number	Y103
Isotype	IgG

Applications

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab32152** in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
WB	★★★★★	1/1000 - 1/5000. Predicted molecular weight: 151 kDa. Can be blocked with VEGF Receptor 1 peptide (ab182457) .
IHC-P	★★★★☆	1/250.
ICC/IF	★★★★★	1/250.
IP		1/100.
Flow Cyt		1/1000.
IHC-Fr	★★★★★	1/250.

Target

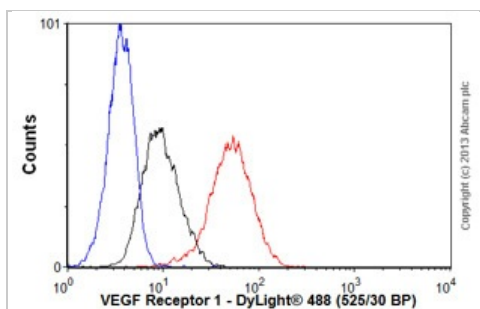
Function	Receptor for VEGF, VEGFB and PGF. Has a tyrosine-protein kinase activity. The VEGF-kinase ligand/receptor signaling system plays a key role in vascular development and regulation of vascular permeability. Isoform sFlt1 may have an inhibitory role in angiogenesis.
Tissue specificity	Mostly in normal lung, but also in placenta, liver, kidney, heart and brain tissues. Specifically expressed in most of the vascular endothelial cells, and also expressed in peripheral blood monocytes. It is not expressed in tumor cell lines. Isoform sFlt1 is strongly expressed in placenta.
Sequence similarities	Belongs to the protein kinase superfamily. Tyr protein kinase family. CSF-1/PDGF receptor subfamily.

Contains 7 Ig-like C2-type (immunoglobulin-like) domains.
 Contains 1 protein kinase domain.

Cellular localization

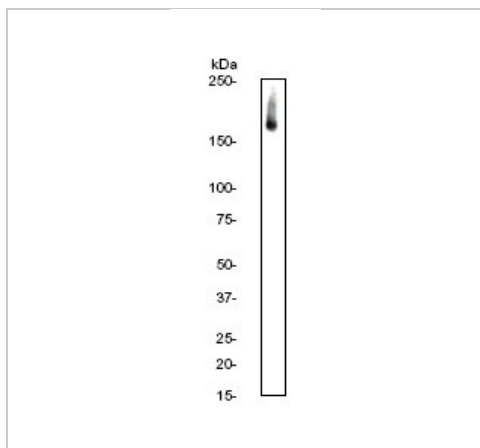
Secreted and Cell membrane.

Anti-VEGF Receptor 1 antibody [Y103] images



Flow Cytometry - Anti-VEGF Receptor 1 antibody [Y103] (ab32152)

Overlay histogram showing A431 cells stained with ab32152 (red line). The cells were fixed with 80% methanol (5 min) and then permeabilized with 0.1% PBS-Tween for 20 min. The cells were then incubated in 1x PBS / 10% normal goat serum / 0.3M glycine to block non-specific protein-protein interactions followed by the antibody (ab32152, 1/1000 dilution) for 30 min at 22°C. The secondary antibody used a goat anti-rabbit DyLight® 488 goat (IgG, H+L) (ab96899) at 1/500 dilution for 30 min at 22°C. Isotype control antibody (black line) was rabbit IgG (monoclonal) (0.1µg/1x10⁶ cells) used under the same conditions. Unlabelled sample (blue line) was also used as a control. Acquisition of >5,000 events were collected using a 20mW Argon ion laser (488nm) and 525/30 bandpass filter.



Western blot - VEGF Receptor 1 antibody [Y103] (ab32152)

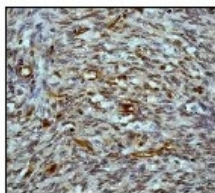
Anti-VEGF Receptor 1 antibody [Y103] (ab32152) at 1/10000 dilution + mouse brain tissue

Predicted band size : 151 kDa
Observed band size : 180 kDa



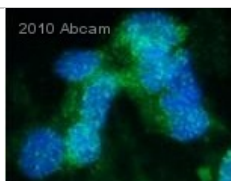
Immunocytochemistry/ Immunofluorescence - VEGF Receptor 1 antibody [Y103] (ab32152)

Immunofluorescent analysis of VEGF receptor 1 expression in A431 cells using 1/250 ab32152.



Immunohistochemistry (Paraffin-embedded sections) - VEGF Receptor 1 antibody [Y103] (ab32152)

Immunohistochemical analysis of VEGF receptor 1 expression in paraffin-embedded skin cancer, using 1/250 ab32152. Immunohistochemical analysis of VEGF receptor 1 expression in paraffin-embedded skin cancer, using 1/250 ab32152.



Immunocytochemistry/Immunofluorescence - VEGF Receptor 1 antibody [Y103] (ab32152)
This image is courtesy of an anonymous Abreview.

ab32152 at 1/200 dilution staining VEGF Receptor 1 in human 293FT cells by Immunocytochemistry/Immunofluorescence. Cells were fixed in formaldehyde and blocked in 5% BSA for 1 hour at 25°C. The primary antibody was used at 1/200 dilution in PBS and incubated with sample at 4°C for 12 hours. An Alexa Fluor® 488 conjugated Goat polyclonal to rabbit IgG was used as secondary at 1/500 dilution.

Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery**
- Response to your inquiry within 24 hours
- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <http://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors
- **Regional variations to our Abpromise may apply to the following countries: China, Korea, Singapore, Malaysia, Taiwan and Thailand, which operate a 120 day guarantee. Please contact your regional office for further details

Visit us at: www.abcam.com

Flk-1 / KDR / VEGFR2**Epitope Specific Rabbit Antibody****Cat. #RB-9239-P0, -P1, or -P (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 200µg/ml)** (Purified Ab with BSA and Azide)**Description:**

Flk-1 / KDR / VEGFR2, a cell membrane receptor kinase, is a high affinity receptor for vascular endothelial growth factor and is putatively involved in the growth of endothelial cells and angiogenesis. It contains seven immunoglobulin-like sequences in the extracellular domain and exhibits sequence similarity to Flt-1 and Flt-4.

Mol. Wt. of Antigen: ~180kDa**Epitope:** C-terminus**Species Reactivity:** Human, Mouse and Rat.
Others not tested.**Immunogen:**

A synthetic peptide derived from C-terminal of human Flk-1.

Applications and Suggested Dilutions:

- Western Blotting (1:50)

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Cellular Localization: Cytoplasmic**Storage and Stability:**

Store vial at 4^oC. When stored at 2-8^oC, this antibody is stable for 24 months.

Supplied As:

Affinity purified antibody fraction from rabbit anti-serum. Prepared in 10mM PBS, pH 7.6, with 0.2% BSA and 15mM sodium azide.

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property

damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only

Flt-4

Rabbit Polyclonal Antibody

Cat. #RB-9255-P0, -P1, or -P (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 200µg/ml) (Purified Ab with BSA and Azide)

Cat. #RB-9255-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)

Description:

Three cell membrane receptor tyrosine kinases, Flt (also designated VEGF-R1), Flk-1 (also designated VEGF-R2) and Flt-4 (also designated VEGF-R3), putatively involved in the growth of endothelial cells, are characterized by the presence of seven immunoglobulin-like sequences in their extracellular domain. On the basis of structural similarity to Flt and Flk-1, it has been speculated that Flt-4 might represent a third receptor for either VEGF or a VEGF-related ligand.

Comments: This antibody is excellent for staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Mol. Wt. of Antigen: 150kDa

Epitope: C-terminus

Species Reactivity: Human, Mouse and Rat. Others not tested.

Immunogen: A synthetic peptide derived from C-terminus of human Flt-4.

Applications and Suggested Dilutions:

- Western Blotting
- Immunoprecipitation
- Immunohistology (Formalin/paraffin)
(Ab at 1:100 for 30 min with LV's Ultra

Vision)

* [Staining of formalin-fixed tissues requires boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0 for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Placenta or breast carcinoma.

Cellular Localization: Cytoplasmic and cell membrane

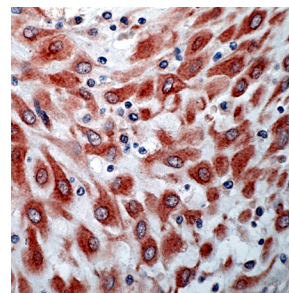
Storage and Stability:

Store vial at 4°C. When stored at 2-8°C, this antibody is stable for 24 months.

Supplied As: Antibody fraction purified from rabbit anti-serum. Prepared in 10mM PBS, pH 7.6, with 0.2% BSA and 15mM sodium azide.

or

Pre-diluted antibody, which is ready-to-use for immunohistochemical staining.



Formalin-fixed, paraffin-embedded human placenta stained with anti-flt-4, (Cat.# RB-9255-P), using peroxidase conjugate and AEC chromogen. Note cytoplasmic staining of trophoblasts.

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only



DESCRIPTION

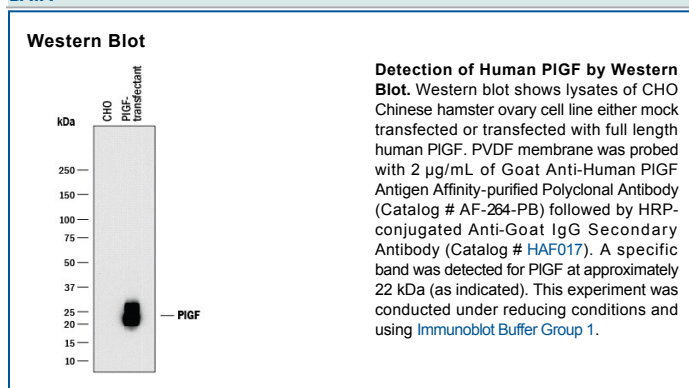
Species Reactivity	Human
Specificity	Detects human PIGF (but not VEGF) in direct ELISAs and Western blots. This antibody will also recognize the heterodimer of VEGF and PIGF. In Western blots, approximately 5% cross-reactivity with recombinant mouse PIGF-2 is observed.
Source	Polyclonal Goat IgG
Purification	Antigen Affinity-purified
Immunogen	<i>E. coli</i> -derived recombinant human PIGF Ala21-Arg149 Accession # CAA38698
Formulation	Lyophilized from a 0.2 µm filtered solution in PBS with Trehalose. See Certificate of Analysis for details.

APPLICATIONS

Please Note: Optimal dilutions should be determined by each laboratory for each application. *General Protocols* are available in the *Technical Information* section on our website.

	Recommended Concentration	Sample
Western Blot	2 µg/mL	See Below

DATA



PREPARATION AND STORAGE

Reconstitution	Reconstitute at 0.2 mg/mL in sterile PBS.
Shipping	The product is shipped at ambient temperature. Upon receipt, store it immediately at the temperature recommended below.
Stability & Storage	<p>Use a manual defrost freezer and avoid repeated freeze-thaw cycles.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 12 months from date of receipt, -20 to -70 °C as supplied. ● 1 month, 2 to 8 °C under sterile conditions after reconstitution. ● 6 months, -20 to -70 °C under sterile conditions after reconstitution.

BACKGROUND

Placenta Growth Factor (PIGF) is a member of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) family of growth factors. PIGF and VEGF share primary structural as well as limited amino acid sequence homology with the A and B chains of PDGF. All eight cysteine residues involved in intra- and inter-chain disulfides are conserved among these growth factors. In their PDGF-like regions, VEGF and PIGF also share approximately 53% amino acid sequence similarity. The gene for PIGF has been mapped to chromosome 14. As a result of alternative splicing, at least two PIGF mRNAs encoding monomeric PIGF precursors containing 149 and 170 amino acid residues have been described. The expression of PIGF is not widespread, but has been detected in human umbilical vein endothelial cells, placenta, choriocarcinoma cell lines, and in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. The PIGF proteins bind with high-affinity to Flt-1, but not to Flk-1/KDR.

Anti-DLL4 antibody ab7280

★★★★★ 7 Abreviews | 18 References | 3 Images

Overview

Product name	Anti-DLL4 antibody
Description	Rabbit polyclonal to DLL4
Tested applications	IHC-P, WB, ICC/IF, ELISA
Species reactivity	Reacts with: Mouse, Human
Immunogen	Synthetic peptide: AWHAPGDDLRPEAL-C conjugated to KLH, corresponding to amino acids 121-134 of Human Delta4.
Positive control	mouse pancreas

 Run BLAST with 

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Store at +4°C short term (1-2 weeks). Aliquot and store at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze / thaw cycles.
Storage buffer	Preservative: 0.01% Sodium Azide Constituents: 0.15M Sodium Chloride, 0.02M Potassium Phosphate. pH 7.2
Purity	Immunogen affinity purified
Clonality	Polyclonal
Isotype	IgG

Applications

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab7280** in the following tested applications.

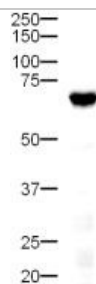
The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
<u>IHC-P</u>	★★★★☆	1/50.
<u>WB</u>	★★★★★	1/500 - 1/2500. Detects a band of approximately 70 kDa (predicted molecular weight: 74 kDa).
<u>ICC/IF</u>		Use at an assay dependent dilution.
<u>ELISA</u>		1/5000 - 1/25000.

Target

Function	Plays a role in the Notch signaling pathway. Activates Notch-1 and Notch-4.
Tissue specificity	Expressed in vascular endothelium.
Sequence similarities	Contains 1 DSL domain. Contains 8 EGF-like domains.
Domain	The Delta-Serrate-Lag2 (DSL) domain is required for binding to the Notch receptor.
Post-translational modifications	Ubiquitinated by MIB (MIB1 or MIB2), leading to its endocytosis and subsequent degradation.
Cellular localization	Membrane.

Anti-DLL4 antibody images



Western blot - DLL4 antibody (ab7280)

Predicted band size : 74 kDa

Western blot using ab7280 at 1/500 on mouse Pancreas tissue.

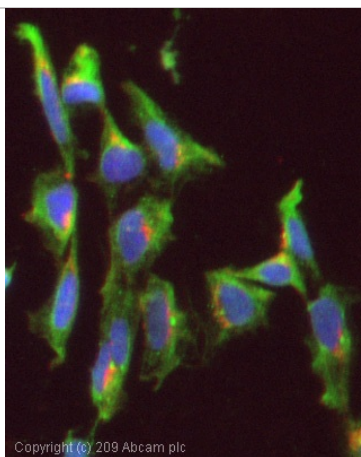
20µg of cell lysate per lane.

Secondary antibody: Goat anti-rabbit HRP ab6721 (1/5000)

Exposure time: 3 minutes.

Expected molecular weight: 74 kDa

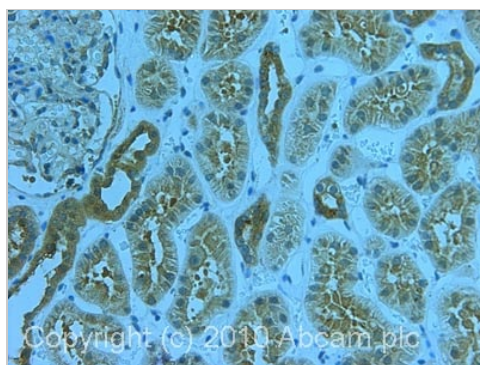
Western blot using ab7280 at 1/500 on mouse Pancreas tissue. 20µg of cell lysate per lane. Secondary ab: Goat anti-rabbit IgG ab6721 (1/5000) Exposure time: 3 minutes. Expected molecular weight: 74 kDa



Copyright (c) 2019 Abcam plc

Immunocytochemistry/ Immunofluorescence-DLL4 antibody(ab7280)

ICC/IF image of ab7280 stained Hek293 cells. The cells were 4% PFA fixed (10 min) and then incubated in 1%BSA / 10% normal goat serum / 0.3M glycine in 0.1% PBS-Tween for 1h to permeabilise the cells and block non-specific protein-protein interactions. The cells were then incubated with the antibody (ab7280, 1µg/ml) overnight at +4°C. The secondary antibody (green) was Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) used at a 1/1000 dilution for 1h. Alexa Fluor® 594 WGA was used to label plasma membranes (red) at a 1/200 dilution for 1h. DAPI was used to stain the cell nuclei (blue) at a concentration of 1.43µM



Copyright (c) 2011 Abcam plc

Immunohistochemistry (Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections)-DLL4 antibody(ab7280)

IHC image of ab7280 staining in human kidney formalin fixed paraffin embedded tissue section, performed on a Leica Bond™ system using the standard protocol F. The section was pre-treated using heat mediated antigen retrieval with sodium citrate buffer (pH6, epitope retrieval solution 1) for 20 mins. The section was then incubated with ab7280, 5µg/ml, for 15 mins at room temperature and detected using an HRP conjugated compact polymer system. DAB was used as the chromogen. The section was then counterstained with haematoxylin and mounted with DPX

For other IHC staining systems (automated and non-automated) customers should optimize variable parameters such as antigen retrieval conditions, primary antibody concentration and antibody incubation times.

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery**
- Response to your inquiry within 24 hours

- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <http://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors
- **Regional variations to our Abpromise may apply to the following countries: China, Korea, Singapore, Malaysia, Taiwan and Thailand, which operate a 120 day guarantee. Please contact your regional office for further details

Visit us at: www.abcam.com

Notch-1 Ab-1 (Clone A6)

Mouse Monoclonal Antibody

Cat. #MS-1339-P0, -P1, or -P (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 200µg/ml) (Purified Ab with BSA and Azide)

Cat. #MS-1339-P1ABX or -PABX (0.1ml or 0.2ml at 1.0mg/ml) (Purified Ab without BSA and Azide)

Description: The *notch* gene belongs to a family of epidermal growth factor (EGF) like homeotic genes, which encode transmembrane proteins with a variable number of cysteine-rich EGF-like repeats in the extracellular region. Four *notch* genes have been described in mammals, which include *notch-1*, *notch-2*, *notch-3*, and *notch-4*(Int-3), which have been implicated in the differentiation of the nervous system and other structures. The EGF-like proteins Delta and Serrate have been identified as ligands of *notch-1*. Mature *notch* proteins are heterodimeric receptors derived from the cleavage of *notch* pre-proteins into an extracellular subunit (N^{EC}) containing multiple EGF-like repeats and a transmembrane subunit including intracellular region (Ntm). Alteration of *notch-1* signaling or expression may contribute to tumorigenesis.

Comments: Ab-1 has not been tested for its cross reaction with *Notch-2*.

Mol. Wt. of Antigen: 290kDa

Epitope: Ligand binding region

Species Reactivity: Human and Mouse. Others-not known.

Clone Designation: A6

Ig Isotype: IgG_{2b}

Immunogen: Recombinant protein encoding the ligand binding region of human *Notch-1*.

Applications and Suggested Dilutions:

- Flow Cytometry
- Immunoprecipitation (Not verified)

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Cellular Localization: Cell membrane, cytoplasmic, nuclear

Supplied As:

200µg/ml of antibody purified from ascites fluid by Protein A chromatography. Prepared in 10mM PBS, pH 7.4, with 0.2% BSA and 0.09% sodium azide. Also available without BSA and azide at 1mg/ml.

Storage and Stability:

Ab with sodium azide is stable for 24 months when stored at 2-8°C. Antibody WITHOUT sodium azide is stable for 36 months when stored at below 0°C.

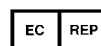
Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only



Anti-Integrin alpha 2+beta 1 antibody [16B4] ab30483

★★★★☆ 1 Abreviews | 3 References | 3 Images

Overview

Product name	Anti-Integrin alpha 2+beta 1 antibody [16B4]
Description	Mouse monoclonal [16B4] to Integrin alpha 2+beta 1
Specificity	We have data to indicate that this antibody may not cross react with Rat. However, this has not been conclusively tested and expression levels may vary in certain cell lines/tissues.
Tested applications	ICC/IF, IP, Flow Cyt, ELISA, IHC-Fr
Species reactivity	Reacts with: Human
Immunogen	Purified human beta 1 preparation from HT1080 fibrosarcoma cell extract.
Positive control	In IF, this antibody gave a positive signal in HepG2 cells.
General notes	ab30483 is identified as capable of immunoprecipitating a non-reducible alpha subunit from ¹²⁵ I surface labelled Human cell line extract. It is confirmed as specific to the alpha 2 subunit by relative expression of antigen on various cell lines by FACS, and its recognition of affinity purified alpha 2 beta 1 in dot blots.

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Store at +4°C short term (1-2 weeks). Aliquot and store at -20°C long term. Avoid repeated freeze / thaw cycles.
Storage buffer	Preservative: 0.02% Sodium Azide Constituents: PBS, pH 7.4
Purity	IgG fraction
Purification notes	ab30483 was purified from tissue culture supernatant
Primary antibody notes	ab30483 is identified as capable of immunoprecipitating a non-reducible alpha subunit from ¹²⁵ I surface labelled Human cell line extract. It is confirmed as specific to the alpha 2 subunit by relative expression of antigen on various cell lines by FACS, and its recognition of affinity purified alpha 2 beta 1 in dot blots.
Clonality	Monoclonal
Clone number	16B4
Myeloma	x63-Ag8.653
Isotype	IgG1
Research Areas	<ul style="list-style-type: none"> › Signal Transduction → Cytoskeleton / ECM → Cell Adhesion → Integrins → Alpha › Signal Transduction → Cytoskeleton / ECM → Cell Adhesion → Integrins → Beta › Cancer → Cancer Metabolism → Response to hypoxia › Metabolism → Pathways and Processes → Metabolism processes → Hypoxia › Metabolism → Types of disease → Cancer

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab30483** in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

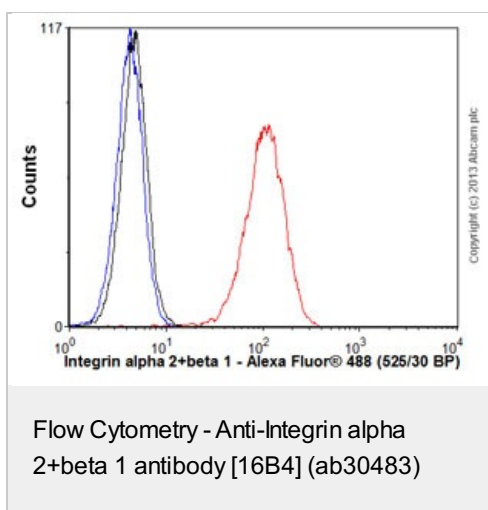
Application	Notes
ICC/IF	ICC/IF: Use a concentration of 1 µg/ml.
IP	IP: Use a concentration of 25 - 50 µg/ml.
Flow Cyt	Flow Cyt: Use 0.1µg for 10 ⁶ cells.
ELISA	ELISA: Use a concentration of 10 µg/ml.
IHC-Fr	IHC-Fr: Use a concentration of 30 - 40 µg/ml.

Target

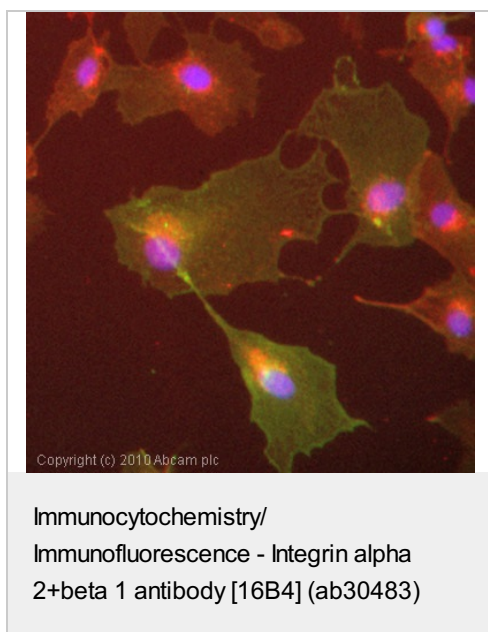
Relevance	Integrins are heterodimeric proteins made up of alpha and beta subunits. At least 18 alpha and 8 beta subunits have been described in mammals. Integrin family members are membrane receptors involved in cell adhesion and recognition in a variety of processes including embryogenesis, hemostasis, tissue repair, immune response and metastatic diffusion of tumour cells.
Cellular localization	Cell Membrane; single-pass type I membrane protein
Database links	Entrez Gene: 3673 Human Entrez Gene: 3688 Human Omim: 135630 Human Omim: 192974 Human SwissProt: P05556 Human SwissProt: P17301 Human Unigene: 482077 Human Unigene: 643813 Human
Alternative names	BR antibody CD29 antibody CD29 antigen antibody CD49B antibody CD49b antigen antibody Collagen receptor antibody Fibronectin Receptor beta polypeptide antibody Fibronectin receptor beta subunit antibody Fibronectin receptor subunit beta antibody FNRB antibody GPIa antibody GPIIA antibody Integrin alpha 2 antibody Integrin beta 1 antibody Integrin VLA 4 beta subunit antibody Integrin VLA 4 subunit beta antibody ITGA2 antibody ITGB1 antibody MDF2 antibody MSK12 antibody Platelet antigen Br antibody Platelet glycoprotein GPIa antibody

Platelet glycoprotein Ia antibody
 Platelet membrane glycoprotein Ia antibody
 Very late activation protein 2 receptor alpha 2 subunit antibody
 VLA 2 alpha chain antibody
 VLA 2 antibody
 VLA2 antibody
 VLA4 antibody
 VLAA2 antibody
 VLAB antibody

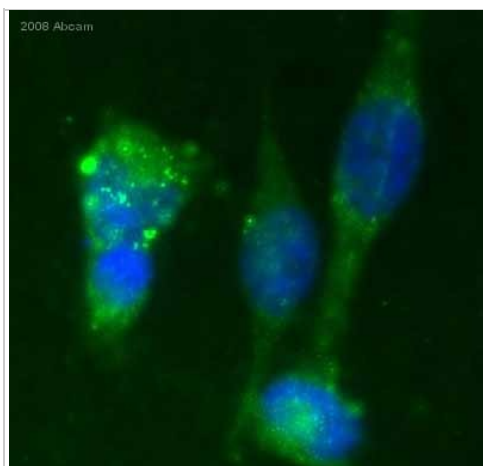
Anti-Integrin alpha 2+beta 1 antibody [16B4] images



Overlay histogram showing HT1080 cells stained with ab30483 (red line). The cells were fixed with 4% paraformaldehyde (10 min) and then permeabilized with 0.1% PBS-Tween for 20 min. The cells were then incubated in 1x PBS / 10% normal goat serum / 0.3M glycine to block non-specific protein-protein interactions followed by the antibody (ab30483, 0.1 µg/1x10⁶ cells) for 30 min at 22°C. The secondary antibody used was Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (ab150113) at 1/2000 dilution for 30 min at 22°C. Isotype control antibody (black line) was mouse IgG1 [ICIGG1] (ab91353, 1 µg/1x10⁶ cells) used under the same conditions. Unlabelled sample (blue line) was also used as a control. Acquisition of >5,000 events were collected using a 20mW Argon ion laser (488nm) and 525/30 bandpass filter. This antibody gave a positive signal in HT1080 cells fixed with 80% methanol (5 min)/permeabilized with 0.1% PBS-Tween for 20 min used under the same conditions.



ICC/IF image of ab30483 stained HepG2 cells. The cells were 4% PFA fixed (10 min) and then incubated in 1%BSA / 10% normal goat serum / 0.3M glycine in 0.1% PBS-Tween for 1h to permeabilise the cells and block non-specific protein-protein interactions. The cells were then incubated with the antibody (ab30483, 1 µg/ml) overnight at +4°C. The secondary antibody (green) was Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) used at a 1/1000 dilution for 1h. Alexa Fluor® 594 WGA was used to label plasma membranes (red) at a 1/200 dilution for 1h. DAPI was used to stain the cell nuclei (blue) at a concentration of 1.43 µM. This antibody also gave a positive result in 4% PFA fixed (10 min) MCF7 cells at 1 µg/ml.



Immunocytochemistry/
Immunofluorescence - Integrin alpha
2+beta 1 antibody [16B4] (ab30483)

This image is courtesy of an Abreview submitted by Dr Sharon Sneddon

ab30483 staining human breast cancer cells by ICC/IF. Cells were PFA fixed and blocked with 1% serum for 16 hours at 20°C prior to incubating with ab30483 (at 30µg/ml) for 16 hours at 4°C. An Alexa Fluor® 488 conjugated goat anti-mouse antibody, diluted 1/200, was used as the secondary.

Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

As standard

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery**
- Response to your inquiry within 24 hours

In addition

- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <http://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors
- **Regional variations to our Abpromise may apply to the following countries: China, Korea, Singapore, Malaysia, Taiwan and Thailand, which operate a 120 day guarantee. Please contact your regional office for further details
- Antibodies tested only in recombinant samples are not covered for use on endogenous samples. Please check the datasheet for information on tested species
- "Predicted to react" information on datasheets is based on sequence homology and provided for reference only
- "Predicted to react" species are not guaranteed, as they have not been tested
- Fast Track products are not covered under the Abpromise. Please see Fast Track terms and condition for additional information
- Abcam biochemicals are novel compounds and we have not tested their biological activity in house. Please use the literature to identify how to use these products effectively. If you require further assistance please contact the scientific support team

Cambridge Office
Abcam plc



330 Cambridge Science Park Cambridge CB4 0FL UK

Tel: +44 (0)1223 696000

Fax: +44 (0)1223 215 215

Email: orders@abcam.com

Boston Office

Abcam Inc.

1 Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA

Tel: (888) 77-ABCAM (22226)

Fax: (877) 774-8286

These numbers are toll free in the US/Canada

Email: us.orders@abcam.com

Visit us at: www.abcam.com

Anti-Integrin beta 3 antibody [BV4] ab7167

★★★★☆ 6 Abreviews | 11 References | 2 Images

Overview

Product name	Anti-Integrin beta 3 antibody [BV4]
Description	Mouse monoclonal [BV4] to Integrin beta 3
Specificity	This monoclonal antibody binds to human beta-3 integrin subunit present on human endothelium cells. Recognizes human beta3 integrin subunit present in Platelet glycoprotein GPIIb-IIIa (integrin alphaIIb/beta3, CD41/CD61) and in the vitronectin receptor (integrin alphaV/beta3, CD51/CD61).
Tested applications	ICC/IF, IHC-P, IHC-Fr, ELISA, WB, IP, Flow Cyt
Species reactivity	Reacts with: Cow, Human
Immunogen	Full length protein corresponding to Human Integrin beta 3. raised against full-length Integrin β3 from endothelial cells of human origin.
Positive control	human endothelium cells (expression of integrin alpha V beta 3 may need to be upregulated by phorbol esters stimulation).

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Upon delivery aliquot. Store at -20°C. Avoid freeze / thaw cycle.
Storage buffer	pH: 7.60 Preservative: 0.02% Sodium azide Constituents: 0.1% BSA, PBS
Purity	Immunogen affinity purified
Clonality	Monoclonal
Clone number	BV4
Isotype	IgG1

Applications

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab7167** in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
ICC/IF	★★★★☆	Use at an assay dependent concentration.
IHC-P	★★★★☆	1/50.
IHC-Fr		1/100. PubMed: 18709641
ELISA		Use at an assay dependent concentration.
WB	★★★★☆	1/50. Detects a band of approximately 90-110 kDa (predicted molecular weight: 87 kDa). Ab33171 and ab34409 are also suitable for use in Western Blotting if a greater volume of antibody is required.
IP		Use at an assay dependent concentration.
Flow Cyt		Use at an assay dependent concentration. PubMed ID: 22700714

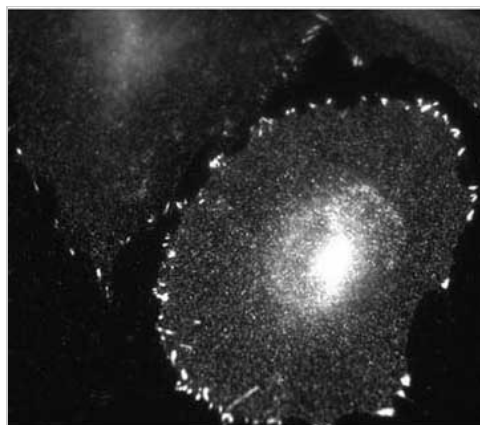
Target

Function	Integrin alpha-V/beta-3 is a receptor for cytotactin, fibronectin, laminin, matrix metalloproteinase-2, osteopontin, osteomodulin, prothrombin, thrombospondin, vitronectin and von Willebrand factor. Integrin alpha-IIb/beta-3 is a receptor for fibronectin, fibrinogen, plasminogen, prothrombin, thrombospondin and vitronectin. Integrins alpha-IIb/beta-3 and alpha-V/beta-3 recognize the sequence R-G-D in a wide array of ligands. Integrin alpha-IIb/beta-3
-----------------	--

recognizes the sequence H-H-L-G-G-A-K-Q-A-G-D-V in fibrinogen gamma chain. Following activation integrin alpha-IIb/beta-3 brings about platelet/platelet interaction through binding of soluble fibrinogen. This step leads to rapid platelet aggregation which physically plugs ruptured endothelial surface. In case of HIV-1 infection, the interaction with extracellular viral Tat protein seems to enhance angiogenesis in Kaposi's sarcoma lesions.

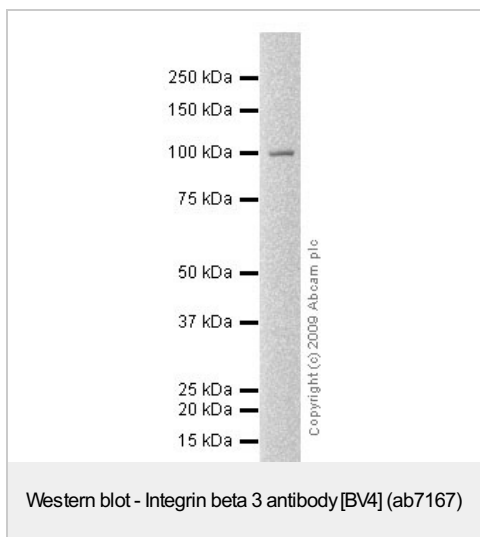
Tissue specificity	Isoform beta-3A and isoform beta-3C are widely expressed. Isoform beta-3A is specifically expressed in osteoblast cells; isoform beta-3C is specifically expressed in prostate and testis.
Involvement in disease	Defects in ITGB3 are a cause of Glanzmann thrombasthenia (GT) [MIM:273800]; also known as thrombasthenia of Glanzmann and Naegeli. GT is the most common inherited disease of platelets. It is an autosomal recessive disorder characterized by mucocutaneous bleeding of mild-to-moderate severity and the inability of this integrin to recognize macromolecular or synthetic peptide ligands. GT has been classified clinically into types I and II. In type I, platelets show absence of the glycoprotein IIb/beta-3 complexes at their surface and lack fibrinogen and clot retraction capability. In type II, the platelets express the glycoprotein IIb/beta-3 complex at reduced levels (5-20% controls), have detectable amounts of fibrinogen, and have low or moderate clot retraction capability. The platelets of GT 'variants' have normal or near normal (60-100%) expression of dysfunctional receptors.
Sequence similarities	Belongs to the integrin beta chain family. Contains 1 VWFA domain.
Post-translational modifications	Phosphorylated on tyrosine residues in response to thrombin-induced platelet aggregation. Probably involved in outside-in signaling. A peptide (AA 740-762) is capable of binding GRB2 only when both Tyr-773 and Tyr-785 are phosphorylated. Phosphorylation of Thr-779 inhibits SHC binding.
Cellular localization	Membrane.

Anti-Integrin beta 3 antibody [BV4] images



Immunocytochemistry/ Immunofluorescence -
Integrin beta 3 antibody [BV4] (ab7167)
Image courtesy of an anonymous Abreview.

[ab7167](#) staining Integrin beta 3 in human HUVEC cells by Immunocytochemistry/ Immunofluorescence. The cells were fixed in paraformaldehyde and then blocked using 3% BSA for 30 minutes. Samples were then incubated with primary antibody at a 1/100 dilution for 16 hours. The secondary antibody used was a goat anti-mouse IgG conjugated to Cy3® ([ab97035](#)) used at a 1/200 dilution.



Western blot - Integrin beta 3 antibody [BV4] (ab7167)

Anti-Integrin beta 3 antibody [BV4] (ab7167) at 1/200 dilution + HeLa (Human epithelial carcinoma cell line)
Whole Cell Lysate at 10 µg

Secondary

Goat polyclonal to Mouse IgG - H&L - Pre-Adsorbed (HRP)
at 1/3000 dilution

Predicted band size : 87 kDa

Observed band size : 100 kDa

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery**
- Response to your inquiry within 24 hours

- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <http://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors
- **Regional variations to our Abpromise may apply to the following countries: China, Korea, Singapore, Malaysia, Taiwan and Thailand, which operate a 120 day guarantee. Please contact your regional office for further details

Visit us at: www.abcam.com

Polyclonal Rabbit anti-ILK antibody Abgent #AP7651e –

See more at:

<http://1degreebio.org/reagents/product/580617/?qid=0#sthash.lbSSfisp.dpuf>

Product Details 1DB_ID: 1DB-001-0000580617

Company: Abgent

Company product code: AP7651e

Product name: ILK Antibody (S246)

Product type: Primary, Antibody

Size/Price: 0.1 mg/ Price ranges, USD: 1-250 251-500 501-750 751+

Target: ILK

Tested applications: ELISA, IHC, WB

Host: Rabbit

Reacts with: Human

Clonality: Polyclonal

Immunogen: This ILK antibody is generated from rabbits immunized with a KLH conjugated synthetic peptide corresponding to amino acid residues surrounding S246 of human ILK1.

Concentration: 0.25 mg/ml

Storage instructions: Maintain products at 4 degrees celcius for one month or -20 degrees celcius for long term

Additional info: Peptide Affinity Purified Rabbit Polyclonal Antibody (Pab)

Format: Purified polyclonal antibody supplied in PBS with 0.09% (W/V) sodium azide.


This antibody is purified through a protein A column, followed by peptide affinity purification - See more at:

<http://1degreebio.org/reagents/product/580617/?qid=0#sthash.lbSSfisp.dpuf>

Anti-FAK (phospho S910) antibody ab61051

1 Image

Overview

Product name	Anti-FAK (phospho S910) antibody
Description	Rabbit polyclonal to FAK (phospho S910)
Specificity	Detects endogenous levels of FAK only when phosphorylated at serine 910.
Tested applications	ELISA, IHC-P
Species reactivity	Reacts with: Human Predicted to work with: Mouse, Rat 
Immunogen	Synthetic phosphopeptide derived from human FAK around the phosphorylation site of serine 910 (E-I-S ^P -P-P).
Positive control	Brain tissue.

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Store at -20°C. Stable for 12 months at -20°C
Storage buffer	Preservative: 0.02% Sodium Azide Constituents: 50% Glycerol, PBS (without Mg ²⁺ and Ca ²⁺), 150mM Sodium chloride, pH 7.4
Purity	Immunogen affinity purified
Purification notes	Affinity-purified from rabbit antiserum by affinity-chromatography using epitope-specific phosphopeptide. The antibody against non-phosphopeptide was removed by chromatography using non-phosphopeptide corresponding to the phosphorylation site.
Clonality	Polyclonal
Isotype	IgG

Applications

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab61051** in the following tested applications.

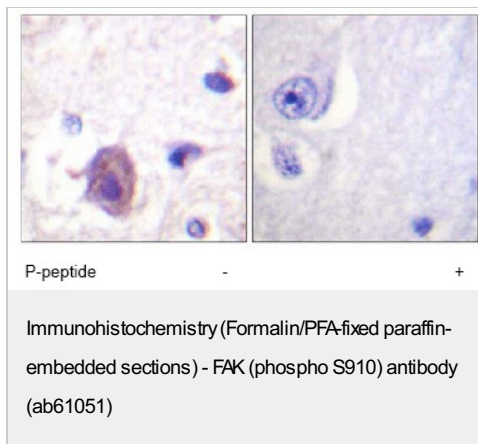
The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
ELISA		1/5000.
IHC-P		1/50 - 1/100.

Target

Function	Non-receptor protein-tyrosine kinase implicated in signaling pathways involved in cell motility, proliferation and apoptosis. Activated by tyrosine-phosphorylation in response to either integrin clustering induced by cell adhesion or antibody cross-linking, or via G-protein coupled receptor (GPCR) occupancy by ligands such as bombesin or lysophosphatidic acid, or via LDL receptor occupancy. Microtubule-induced dephosphorylation at Tyr-397 is crucial for the induction of focal adhesion disassembly. Plays a potential role in oncogenic transformations resulting in increased kinase activity.
Tissue specificity	Expressed in all organs tested, in lymphoid cell lines, but most abundantly in brain.
Sequence similarities	Belongs to the protein kinase superfamily. Tyr protein kinase family. FAK subfamily. Contains 1 FERM domain. Contains 1 protein kinase domain.
Domain	The first Pro-rich domain interacts with the SH3 domain of CRK-associated substrate (BCAR1) and CASL. The carboxy-terminal region is the site of focal adhesion targeting (FAT) sequence which mediates the localization of FAK1 to focal adhesions.
Post-translational modifications	Phosphorylated on 6 tyrosine residues upon activation. Microtubule-induced dephosphorylation at Tyr-397 could be catalyzed by PTPN11 and regulated by ZFYVE21. Dephosphorylated by PTPN11 upon EPHA2 activation by its ligand EFNA1.

Anti-FAK (phospho S910) antibody images



ab61051 at 1/100 dilution staining FAK in human brain by Immunohistochemistry, Paraffin-embedded tissue, in the absence or presence of the immunising peptide.

Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery**
- Response to your inquiry within 24 hours
- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <http://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors
- **Regional variations to our Abpromise may apply to the following countries: China, Korea, Singapore, Malaysia, Taiwan and Thailand, which operate a 120 day guarantee. Please contact your regional office for further details

Visit us at: www.abcam.com

Anti-PI 3 Kinase p85 alpha antibody ab71522

2 Images

Overview

Product name	Anti-PI 3 Kinase p85 alpha antibody
Description	Rabbit polyclonal to PI 3 Kinase p85 alpha
Tested applications	ELISA, IHC-P, WB
Species reactivity	Reacts with: Human
Immunogen	KLH conjugated synthetic peptide corresponding to amino acid residues surrounding Y580 of human PI 3 Kinase p85 alpha
Positive control	Transiently transfected 293 cell lysate and human skeletal muscle tissue

Properties

Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Upon delivery aliquot and store at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze / thaw cycles.
Storage buffer	Preservative: 0.09% Sodium Azide Constituents: PBS
Purity	Protein A purified
Purification notes	ab71522 was purified through a protein A column, followed by peptide affinity purification.
Clonality	Polyclonal
Isotype	IgG
Research Areas	<ul style="list-style-type: none"> › Signal Transduction → Signaling Pathway → Lipid Signaling → Lipid Kinases › Cancer → Signal transduction → Other › Immunology → Innate Immunity → TLR Signaling

Applications

Our [Abpromise guarantee](#) covers the use of **ab71522** in the following tested applications.

The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Notes
ELISA	ELISA: 1/1000.
IHC-P	IHC-P: 1/10 - 1/50.
WB	WB: 1/50 - 1/100. Detects a band of approximately 84 kDa (predicted molecular weight: 84 kDa).

Target

Function	Binds to activated (phosphorylated) protein-Tyr kinases, through its SH2 domain, and acts as an adapter, mediating the association of the p110 catalytic unit to the plasma membrane. Necessary for the insulin-stimulated increase in glucose uptake and glycogen synthesis in insulin-sensitive tissues.
Tissue specificity	Isoform 2 is expressed in skeletal muscle and brain, and at lower levels in kidney and cardiac muscle. Isoform 2 and isoform 4 are present in skeletal muscle (at protein level).
Sequence similarities	Belongs to the PI3K p85 subunit family. Contains 1 Rho-GAP domain. Contains 2 SH2 domains. Contains 1 SH3 domain.

Product Datasheet

Domain	The SH3 domain mediates the binding to CBLB, and to HIV-1 Nef.
Post-translational modifications	Polyubiquitinated in T-cells by CBLB; which does not promote proteasomal degradation but impairs association with CD28 and CD3Z upon T-cell activation. Phosphorylated. Dephosphorylated by PTPRJ.

Target information above from: UniProt accession [P27986](#) The UniProt Consortium

The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010

[Nucleic Acids Res. 38:D142-D148 \(2010\)](#).

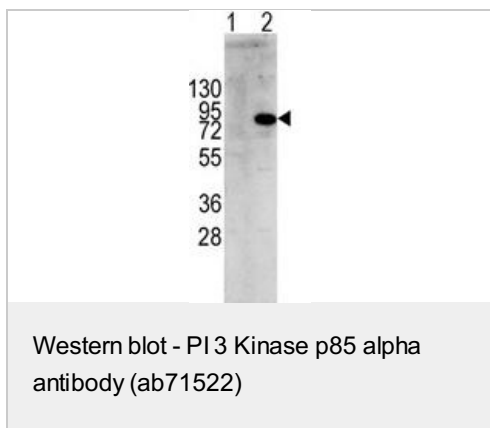
Database links

- [Entrez Gene: 5295 Human](#)
- [Omim: 171833 Human](#)
- [SwissProt: P27986 Human](#)
- [Unigene: 132225 Human](#)
- [Unigene: 604502 Human](#)

Alternative names

GRB 1 antibody
GRB1 antibody
p85 alpha antibody
p85 antibody
p85a antibody
P85A_HUMAN antibody
Phosphatidylinositol 3 kinase associated p 85 alpha antibody
Phosphatidylinositol 3 kinase associated p85 alpha antibody
Phosphatidylinositol 3 kinase regulatory 1 antibody
Phosphatidylinositol 3 kinase regulatory alpha subunit antibody
Phosphatidylinositol 3 kinase regulatory subunit alpha antibody
Phosphatidylinositol 3 kinase regulatory subunit polypeptide 1 antibody
Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha) antibody
Phosphatidylinositol 3-kinase 85 kDa regulatory subunit alpha antibody
Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha antibody
Phosphoinositide 3 kinase regulatory subunit 1 antibody
Phosphoinositide 3 kinase regulatory subunit polypeptide 1 (p85 alpha) antibody
Phosphoinositide 3 kinase regulatory subunit polypeptide 1 antibody
Phosphoinositide 3 kinase, regulatory subunit 1 (alpha) antibody
PI3 kinase p85 alpha subunit antibody
PI3 kinase p85 subunit alpha antibody
PI3-kinase regulatory subunit alpha antibody
PI3-kinase subunit p85-alpha antibody
PI3K antibody
PI3K regulatory subunit alpha antibody
PIK3R 1 antibody
PIK3R1 antibody
PtdIns 3 kinase p85 alpha antibody
PtdIns-3-kinase regulatory subunit alpha antibody
PtdIns-3-kinase regulatory subunit p85-alpha antibody

Anti-PI 3 Kinase p85 alpha antibody images



All lanes : Anti-PI 3 Kinase p85 alpha antibody (ab71522) at 1/50 dilution

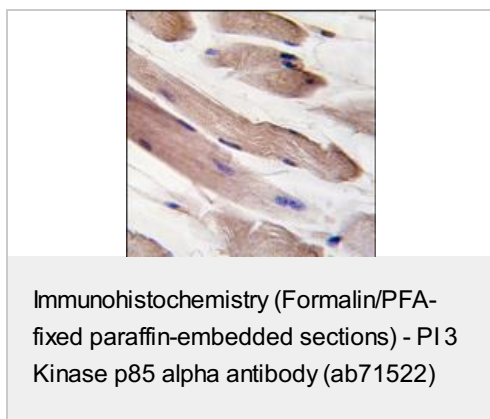
Lane 1 : Non transfected 293 cell line lysate

Lane 2 : 293 cell line lysate transiently transfected with the PI 3 Kinase p85 alpha gene

Lysates/proteins at 2 µg per lane.

Predicted band size : 84 kDa

Observed band size : 84 kDa



ab71522, at a 1/10 dilution, staining PI 3 Kinase p85 alpha in formalin fixed, paraffin embedded human skeletal muscle tissue by Immunohistochemistry. ab71522 was peroxidase conjugated to the secondary antibody, followed by DAB staining.

Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

As standard

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery**
- Response to your inquiry within 24 hours

In addition

- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <http://www.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

Terms and conditions

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors
- **Regional variations to our Abpromise may apply to the following countries: China, Korea, Singapore, Malaysia, Taiwan and Thailand, which operate a 120 day guarantee. Please contact your regional office for further details
- Antibodies tested only in recombinant samples are not covered for use on endogenous samples. Please check the datasheet for information on tested species
- "Predicted to react" information on datasheets is based on sequence homology and provided for reference only

Product Datasheet

- "Predicted to react" species are not guaranteed, as they have not been tested
- Fast Track products are not covered under the Abpromise. Please see Fast Track terms and condition for additional information
- Abcam biochemicals are novel compounds and we have not tested their biological activity in house. Please use the literature to identify how to use these products effectively. If you require further assistance please contact the scientific support team



Cambridge Office

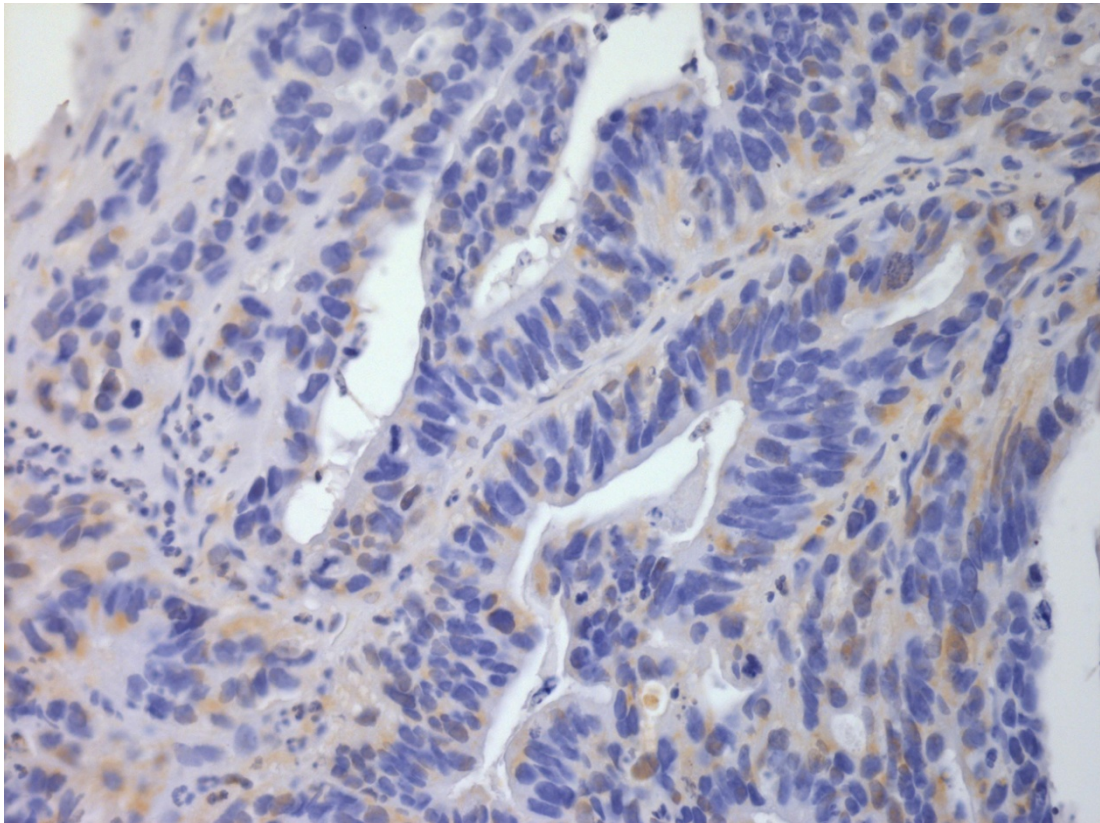
Abcam plc
330 Cambridge Science Park Cambridge CB4 0FL UK
Tel: +44 (0)1223 696000
Fax: +44 (0)1223 215 215
Email: orders@abcam.com

Boston Office

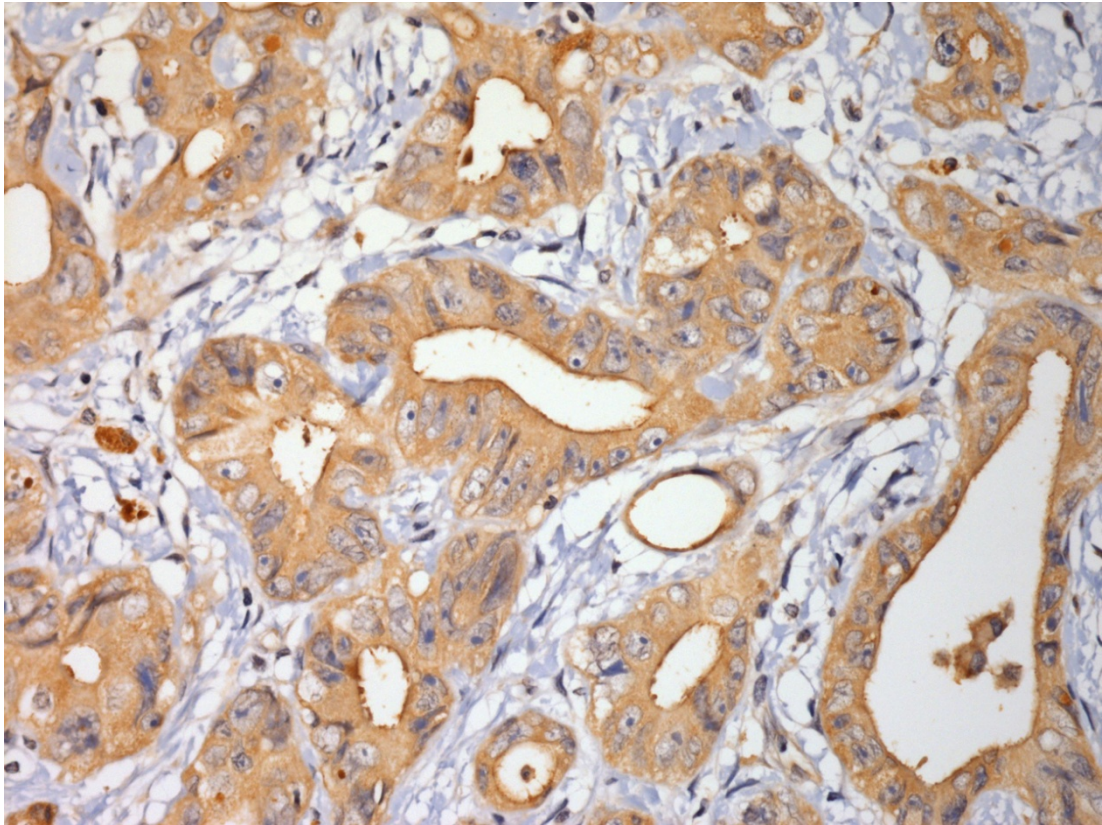
Abcam Inc.
1 Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA
Tel: (888) 77-ABCAM (22226)
Fax: (877) 774-8286
These numbers are toll free in the US/Canada
Email: us.orders@abcam.com

Visit us at: www.abcam.com

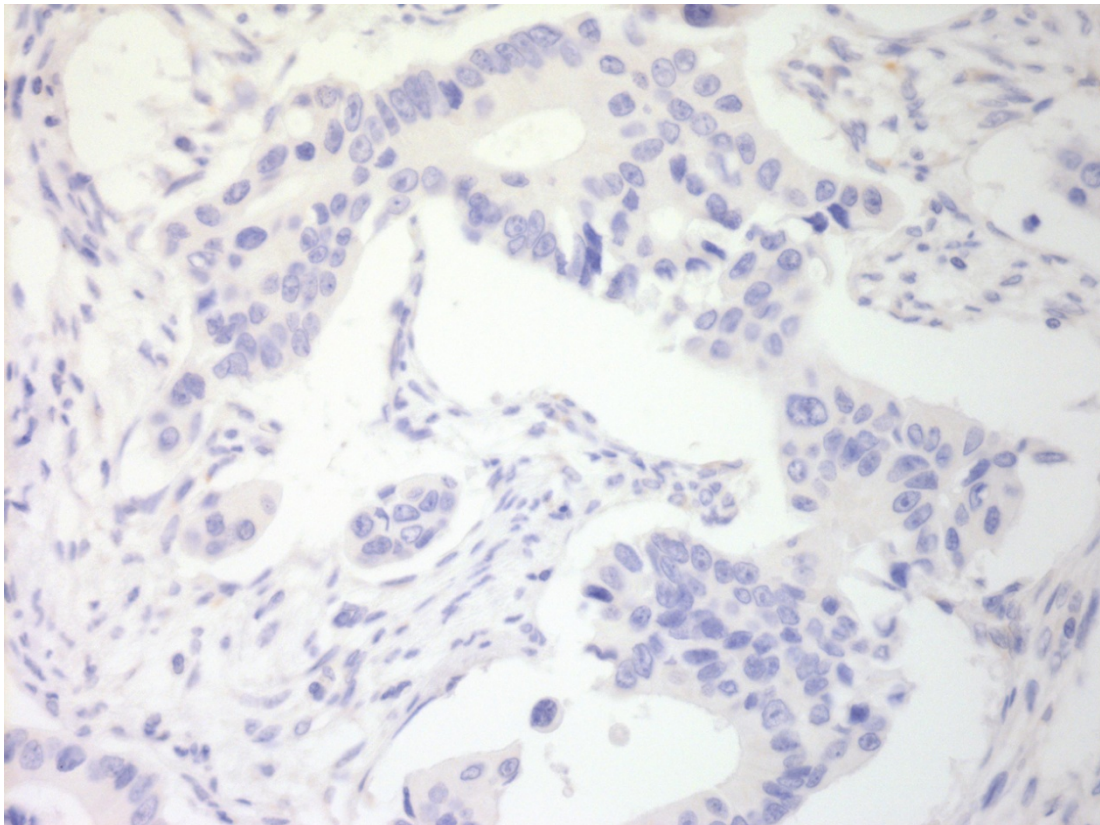
Anexo 5 - Fotos dos cortes histológicos com reações de imunohistoquímica



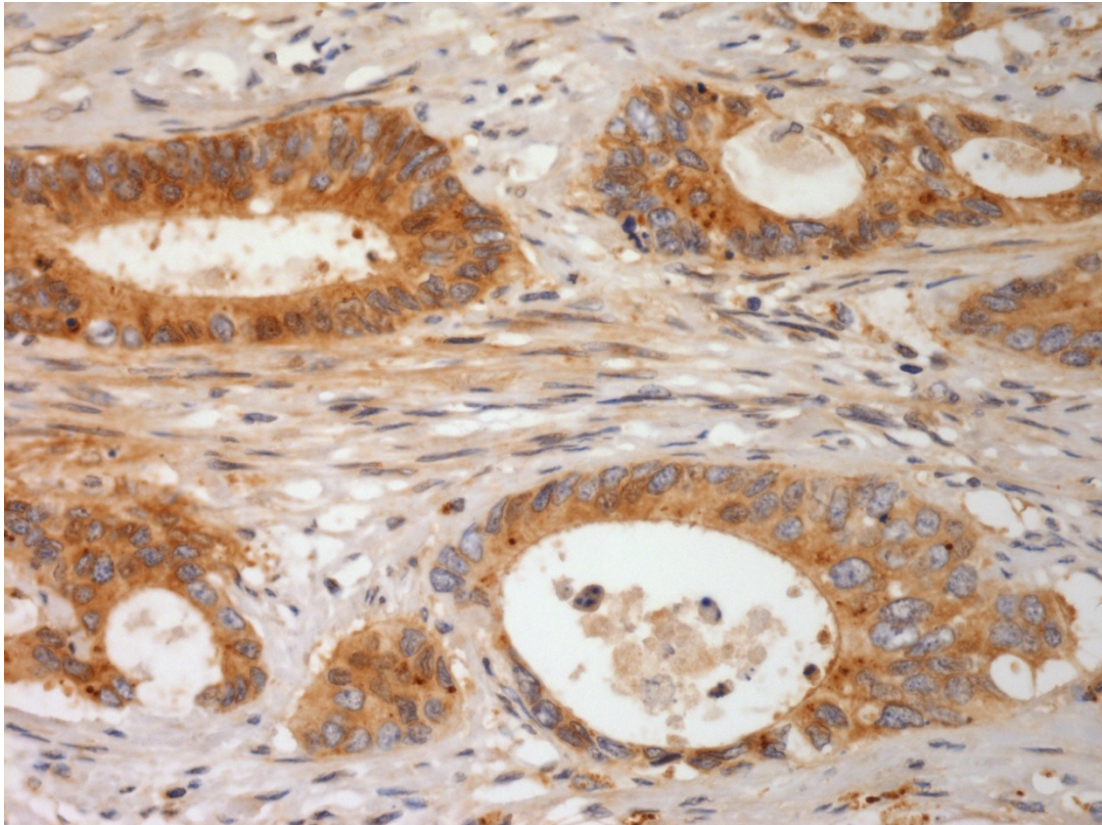
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador VEGFR1



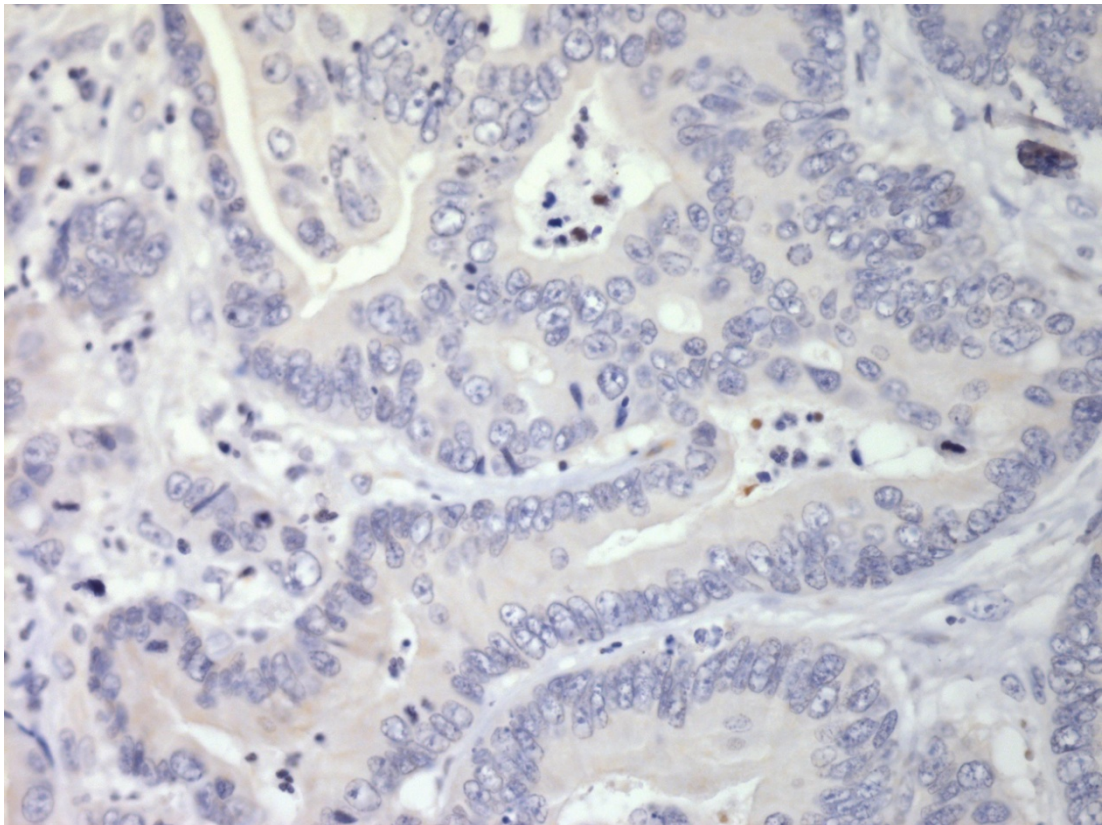
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando positividade (3+) do marcador VEGFR1



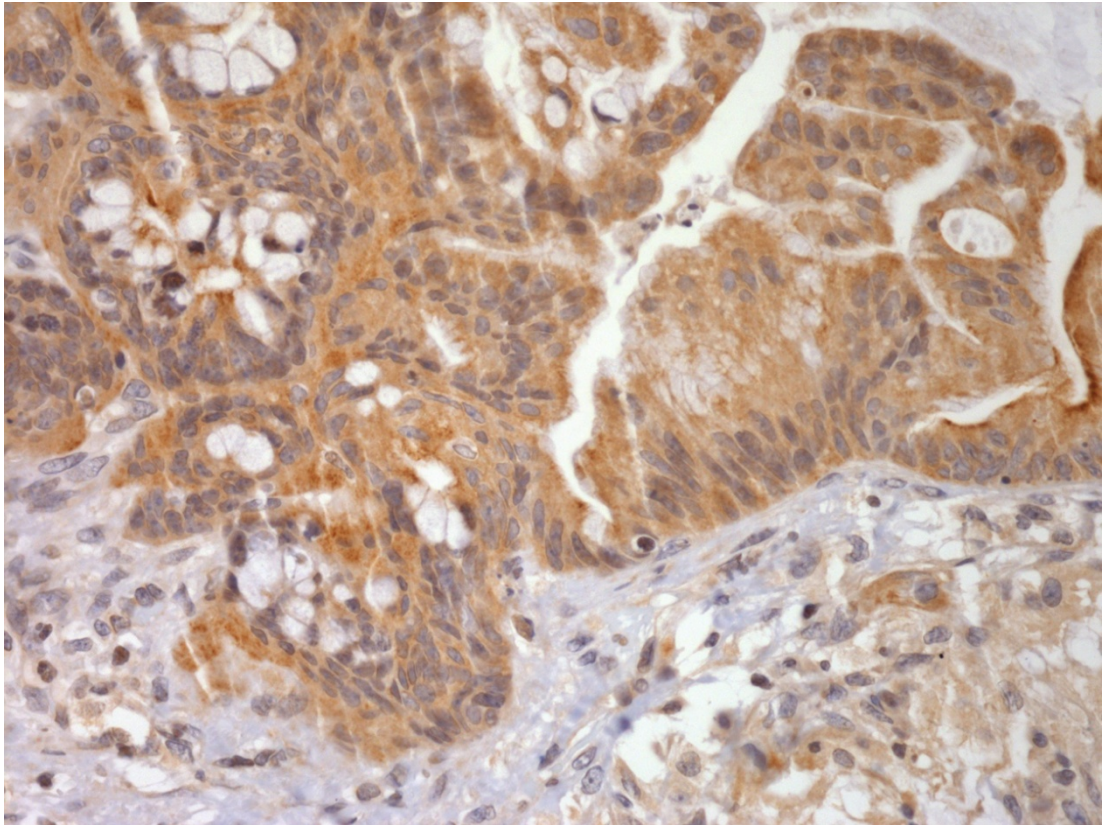
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador VEGFR2.



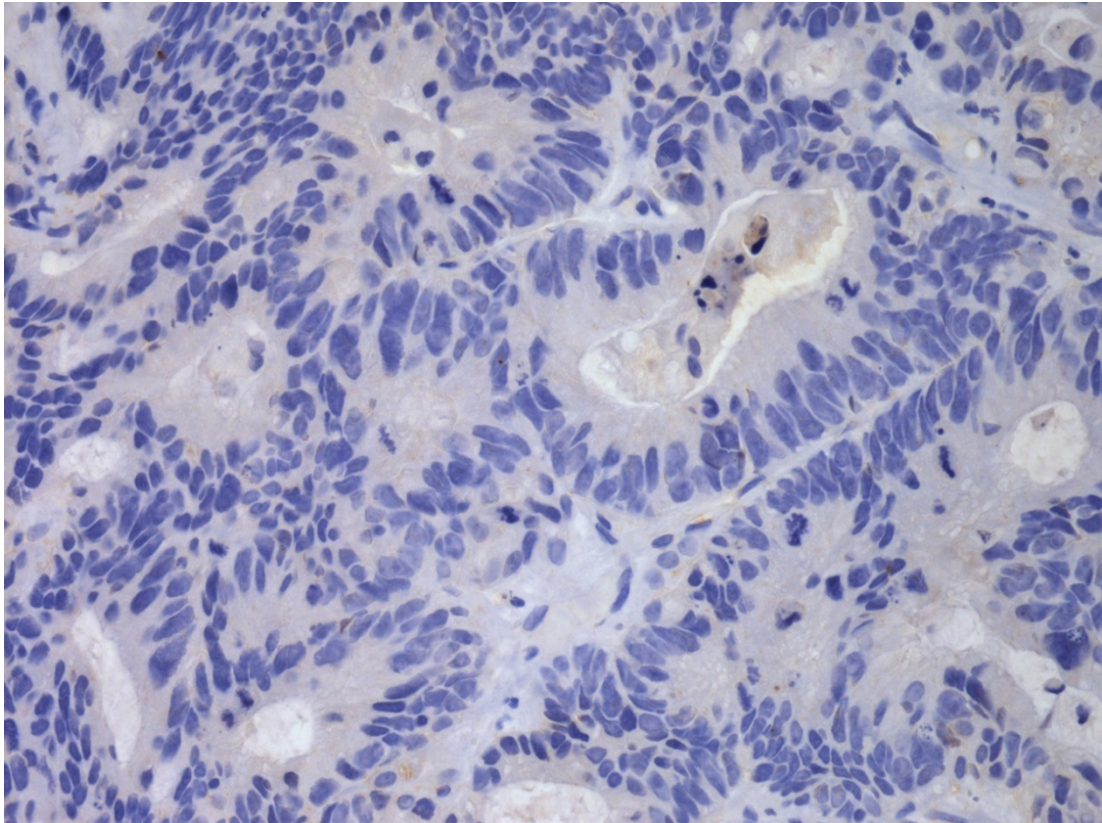
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando positividade (3+) do marcador VEGFR2



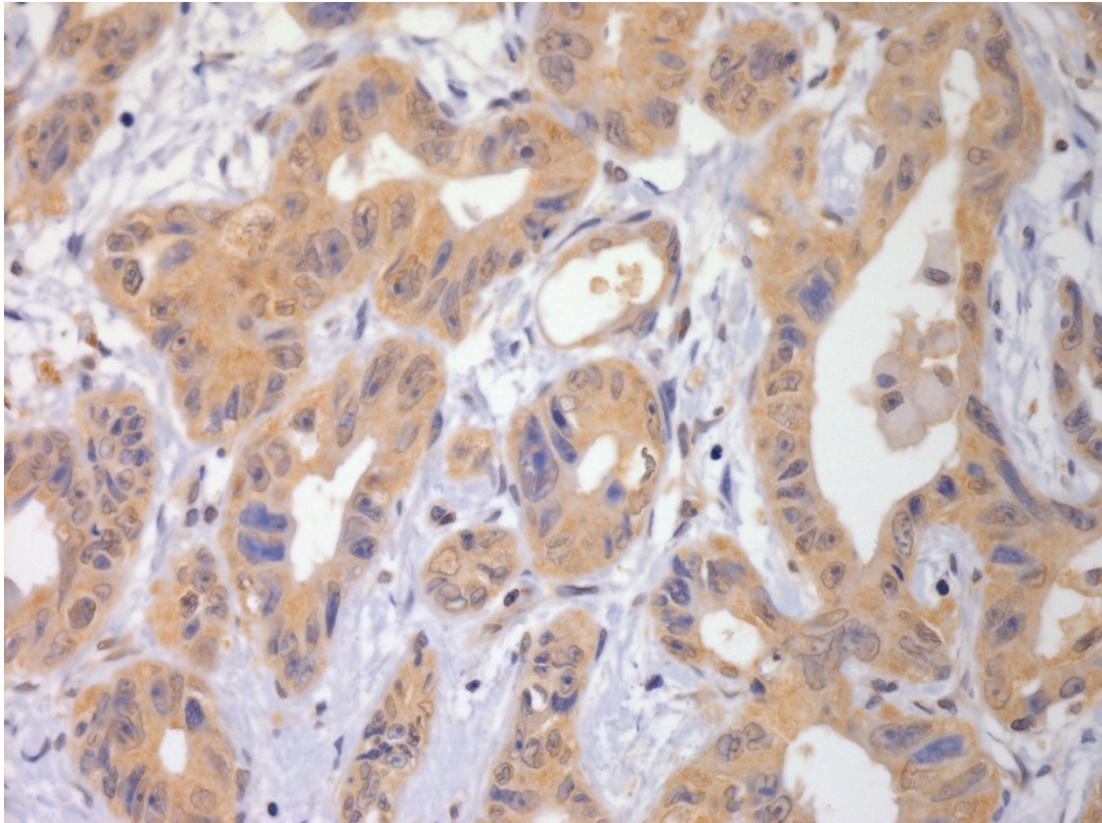
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador VEGFR3.



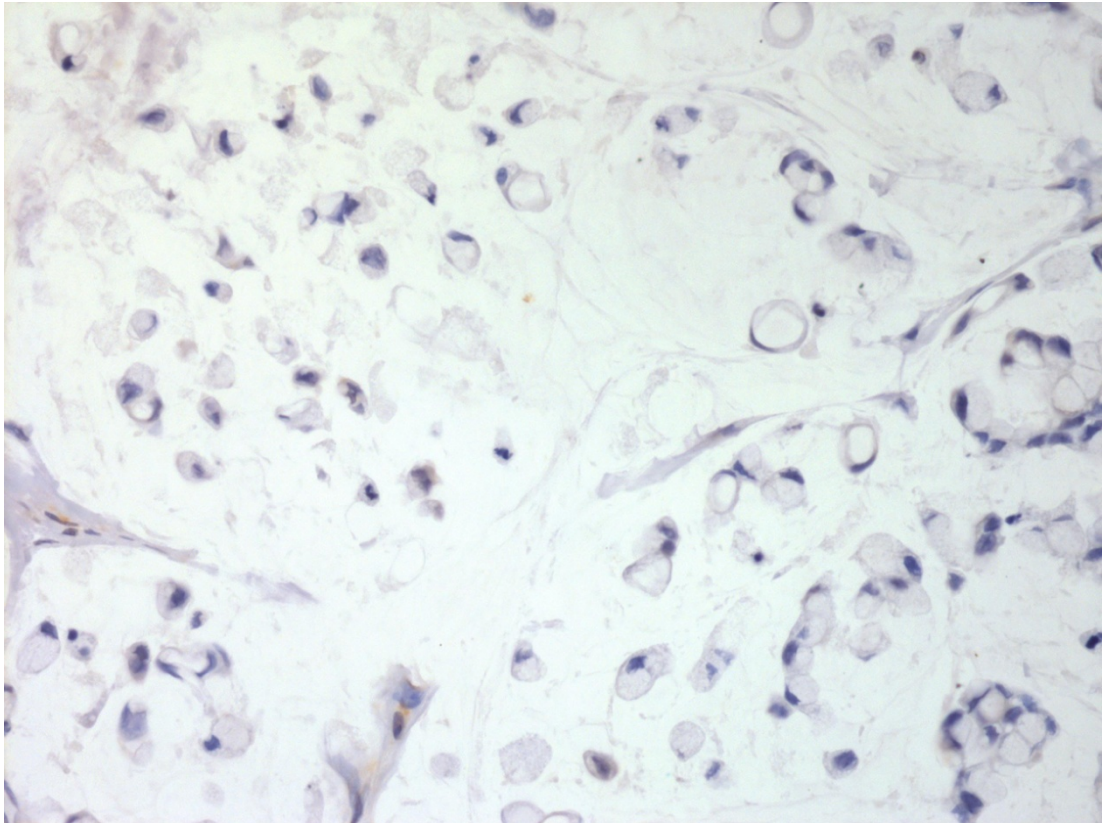
Fotomicrografia em aumento de 400X, evidenciando positividade do marcador VEGFR3



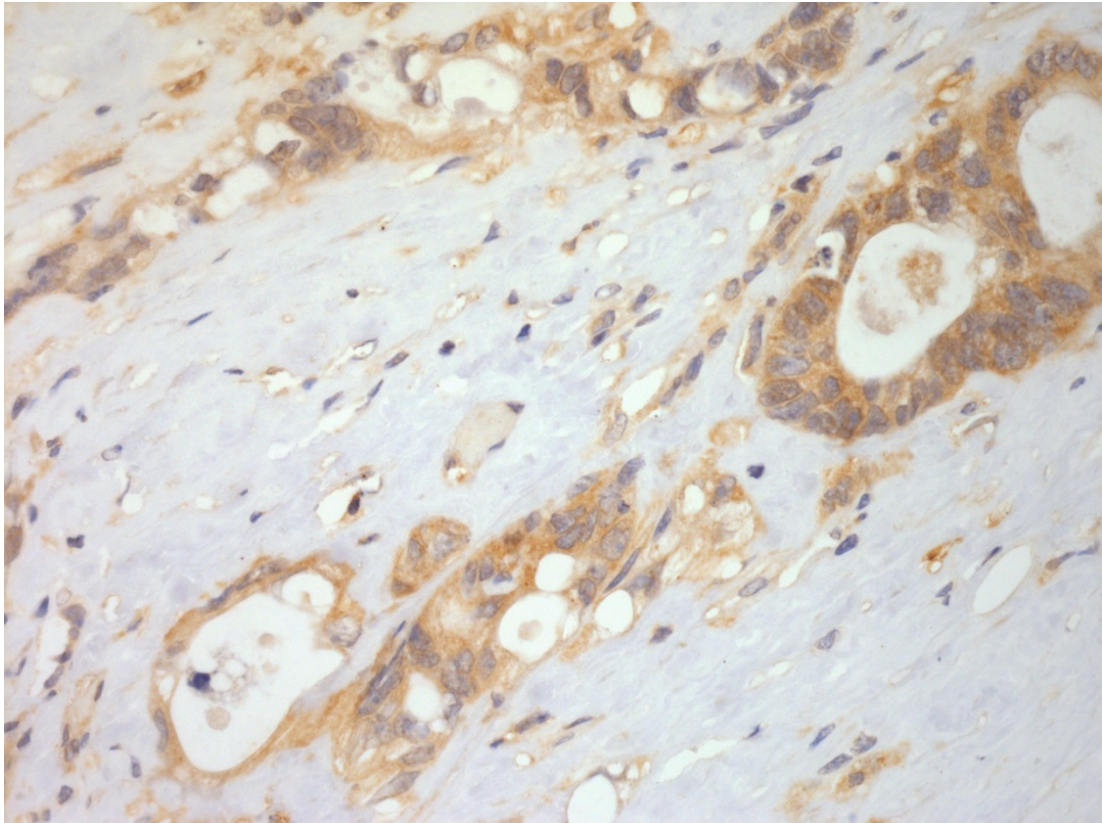
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador PIGF.



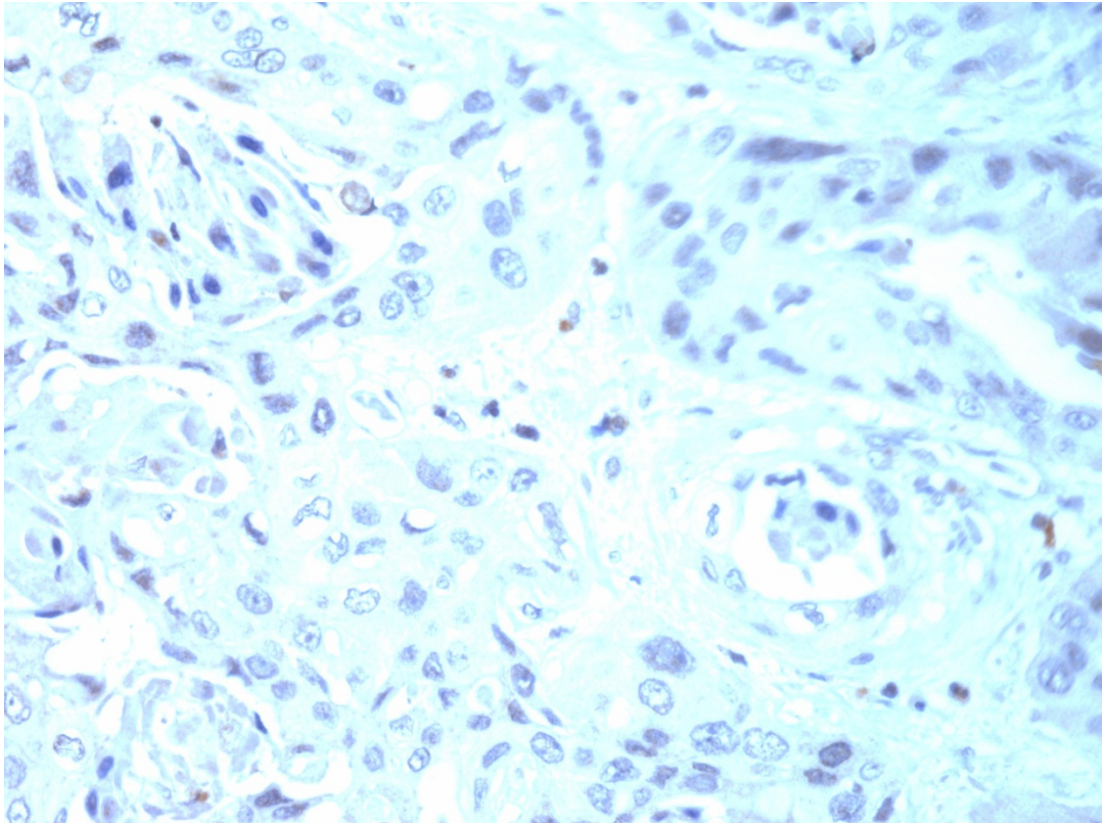
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando positividade (3+) do marcador PIGF



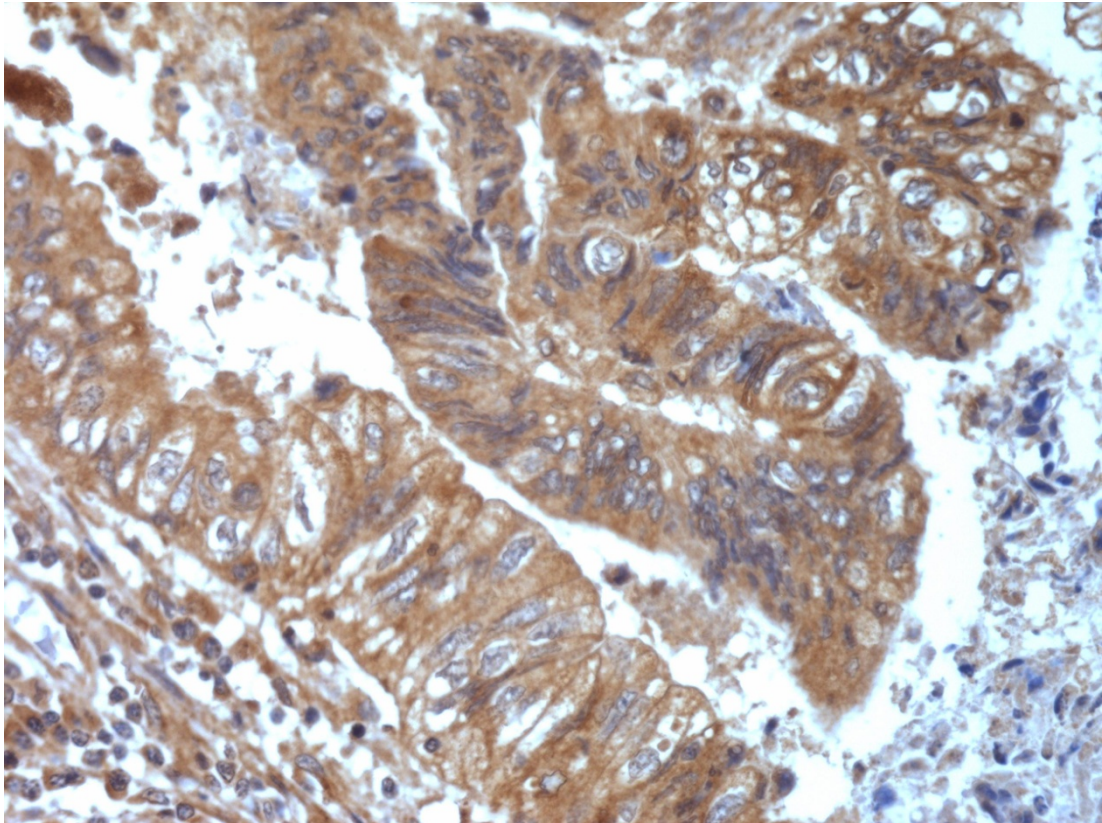
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador DDL4



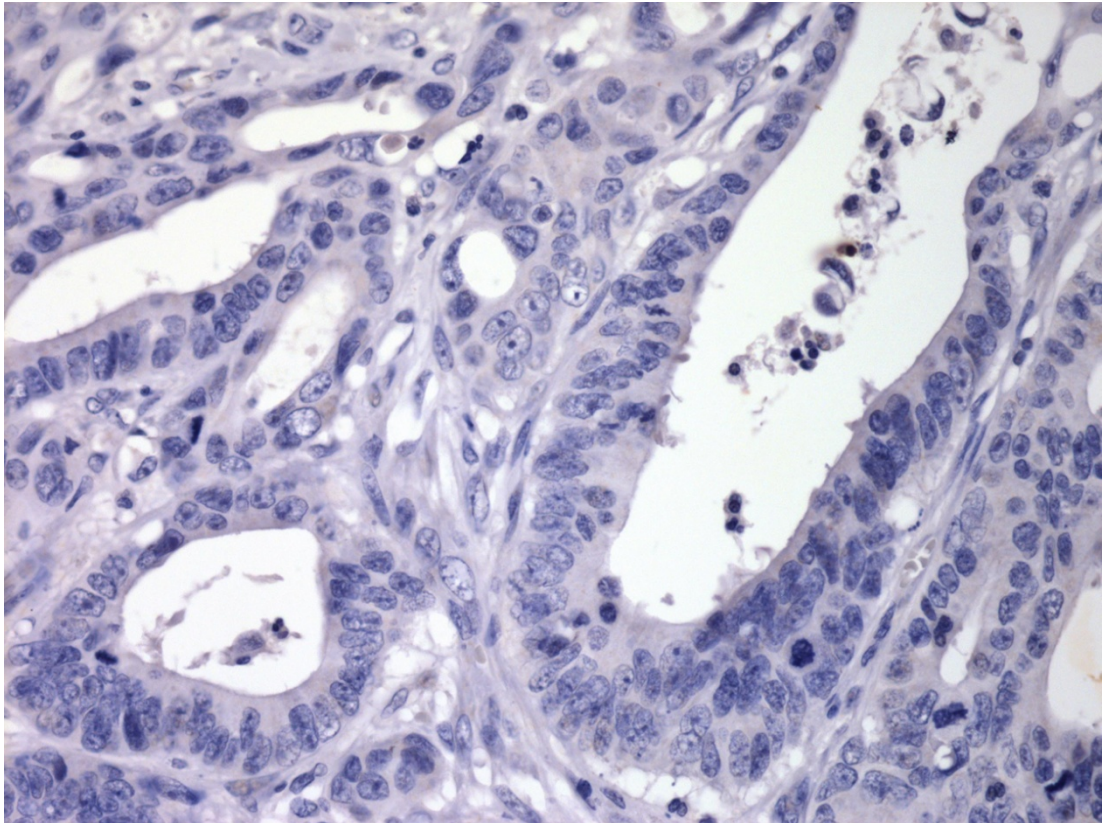
Fotomicrografia em aumento de 400X, evidenciando positividade do marcador DDL4



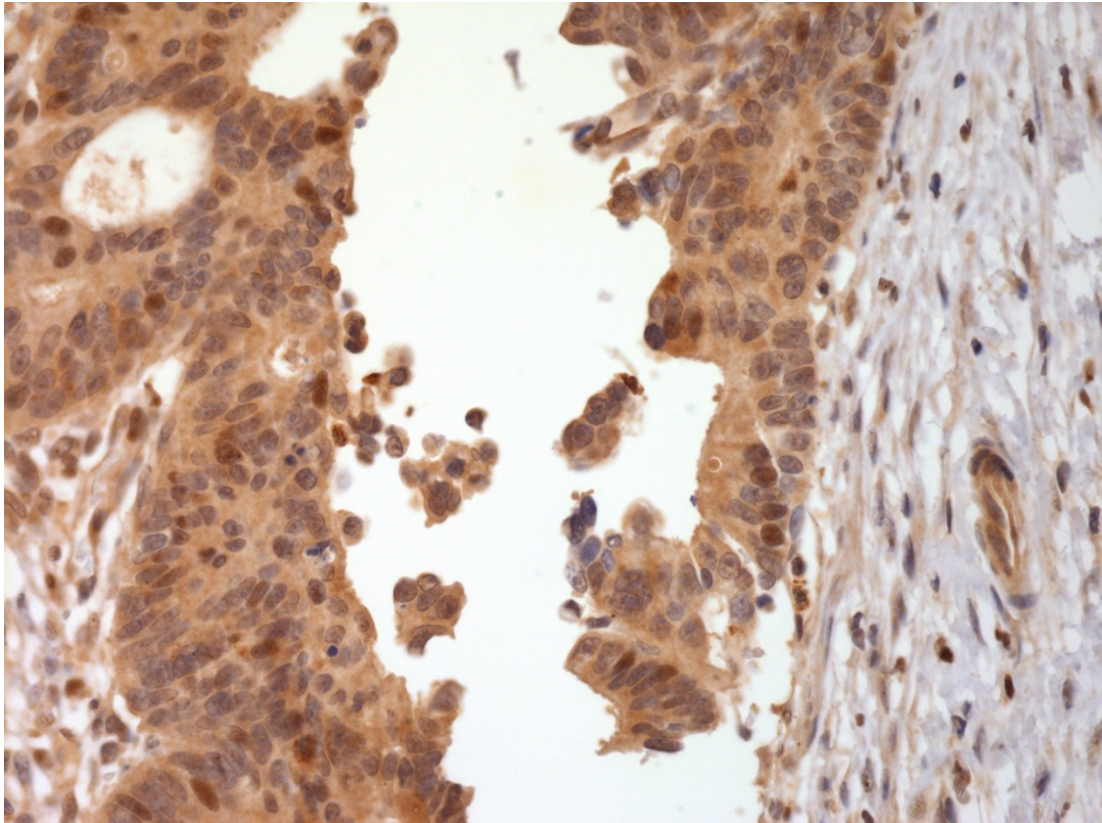
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador NOTCH1



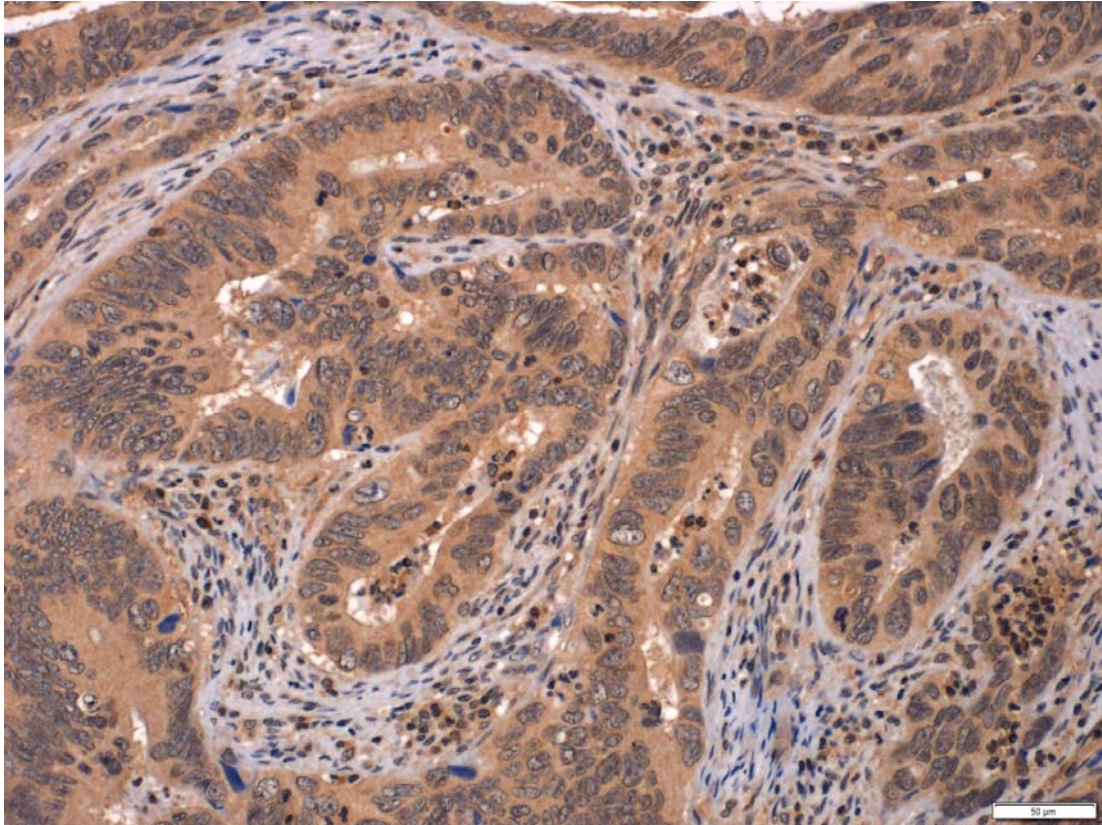
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando positividade (3+) do marcador NOTCH1



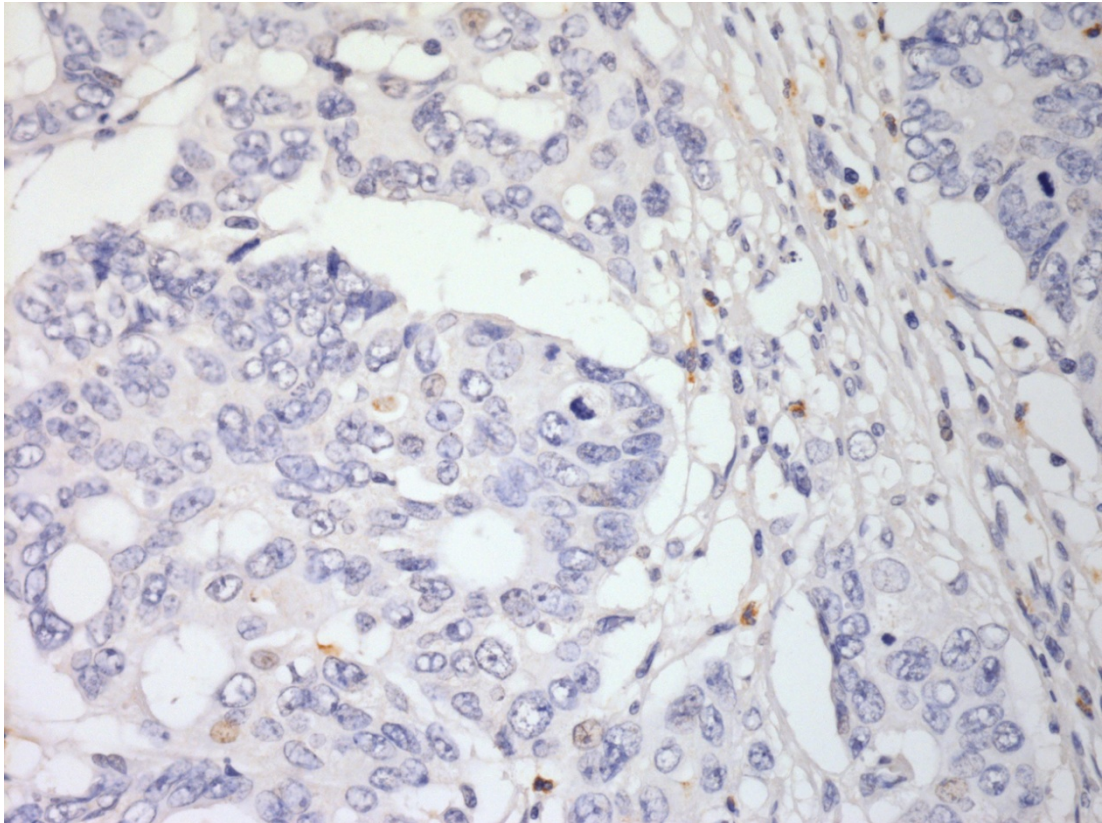
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador Integrina $\alpha 2 \beta 1$



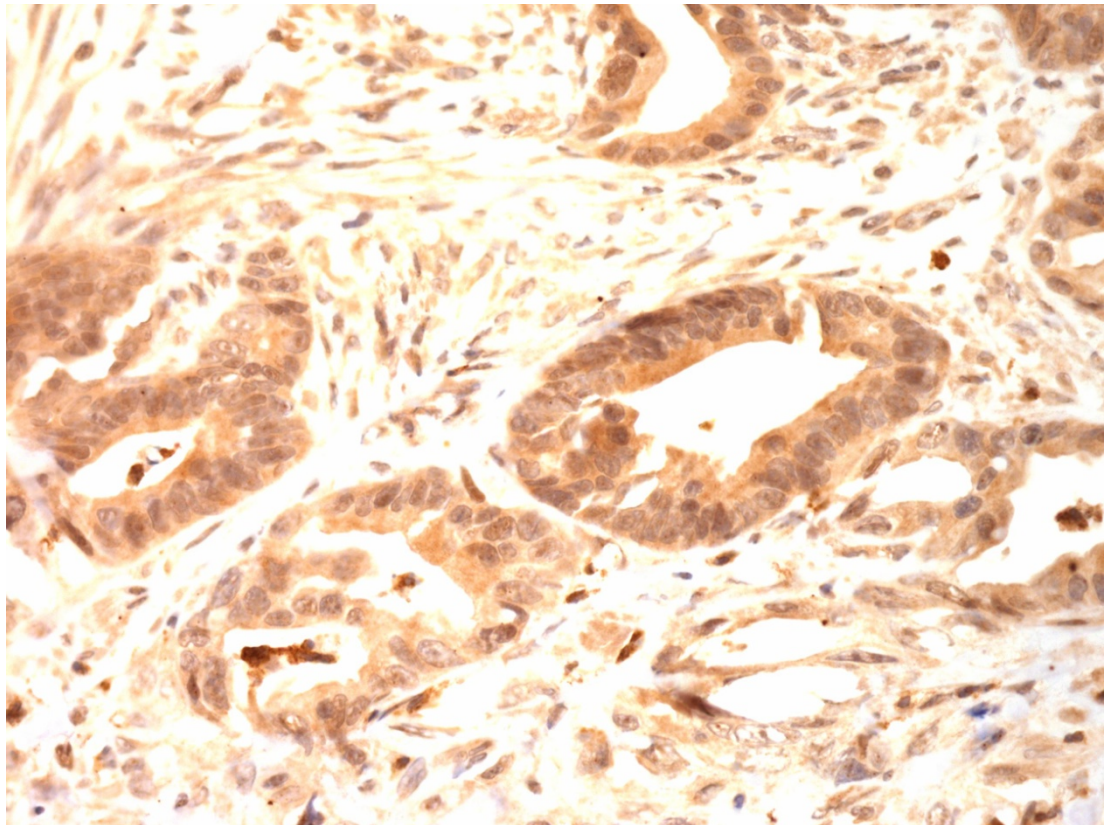
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando positividade (3+) do marcador Integrina $\alpha 2 \beta 1$



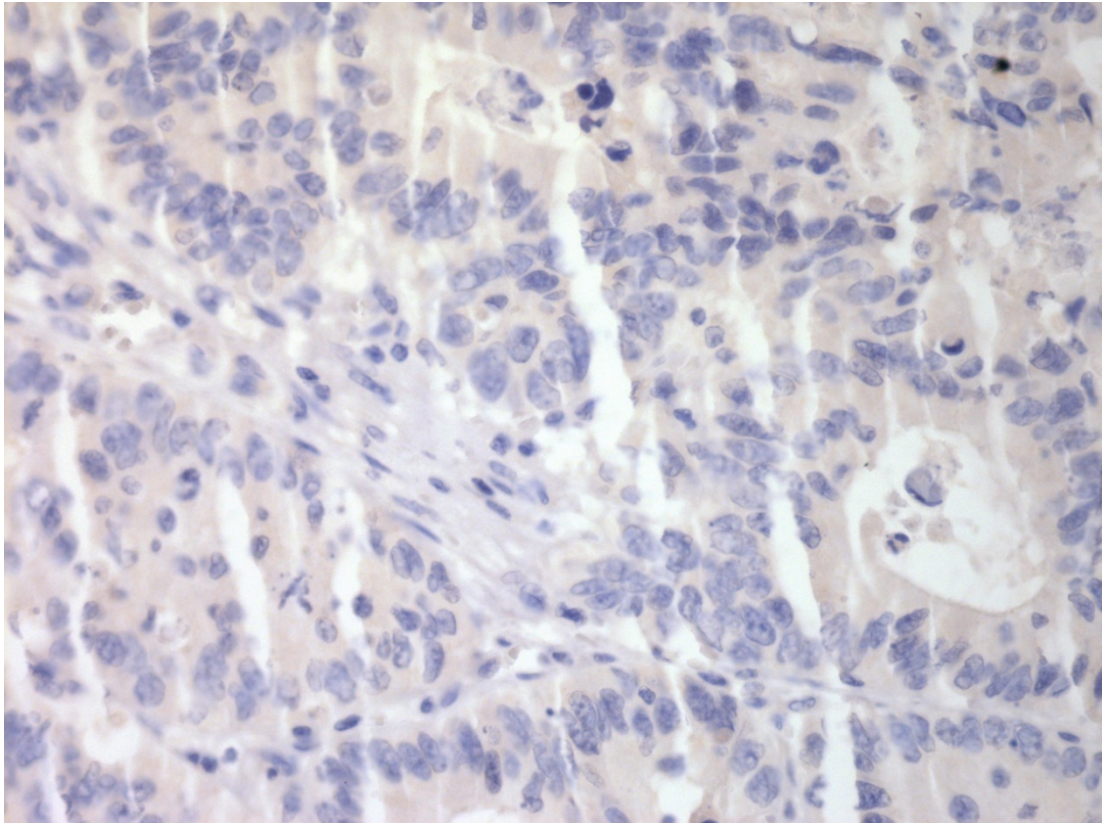
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando positividade (3+) do marcador Integrina $\alpha\beta 3$



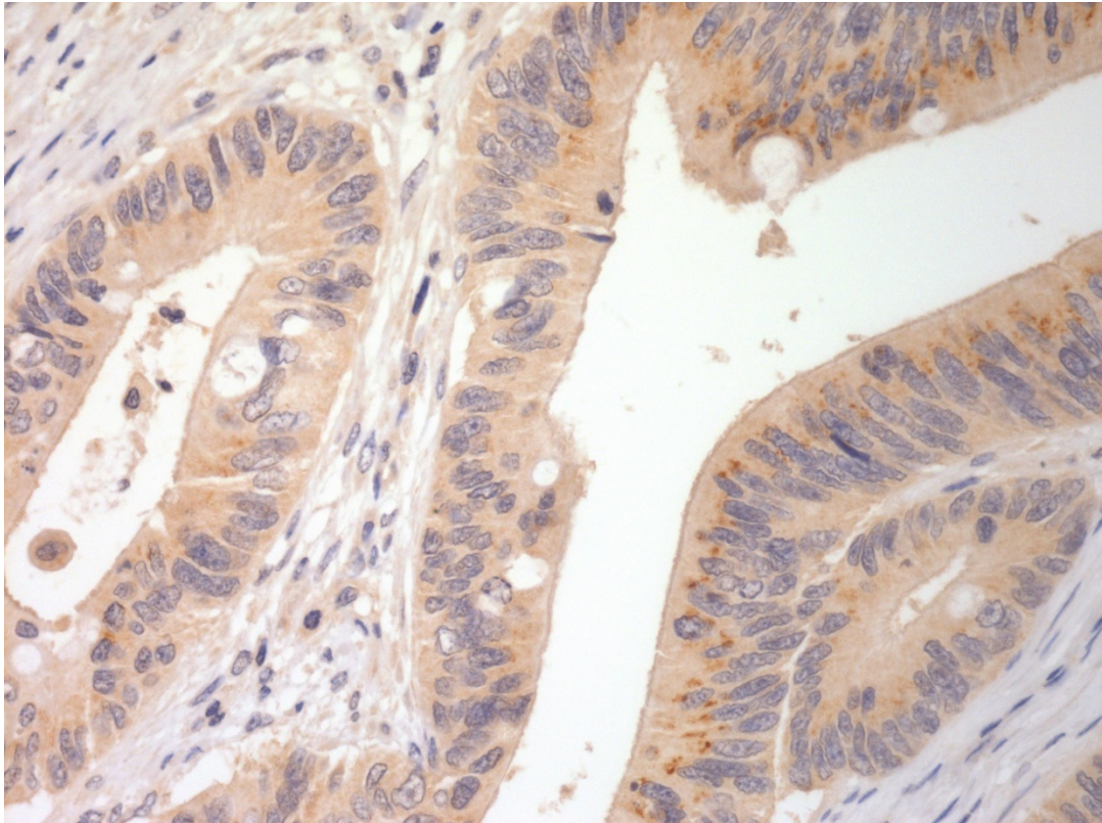
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador ILK



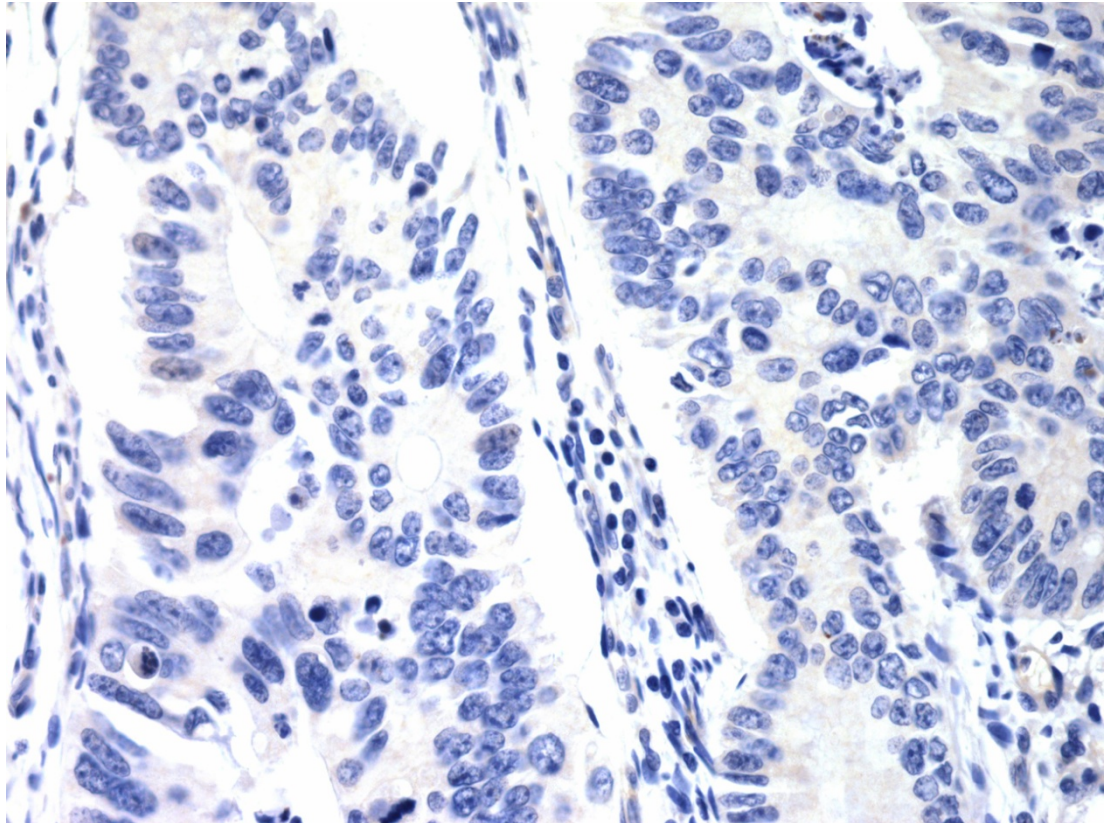
Fotomicrografia em aumento de 400X, evidenciando positividade do marcador ILK



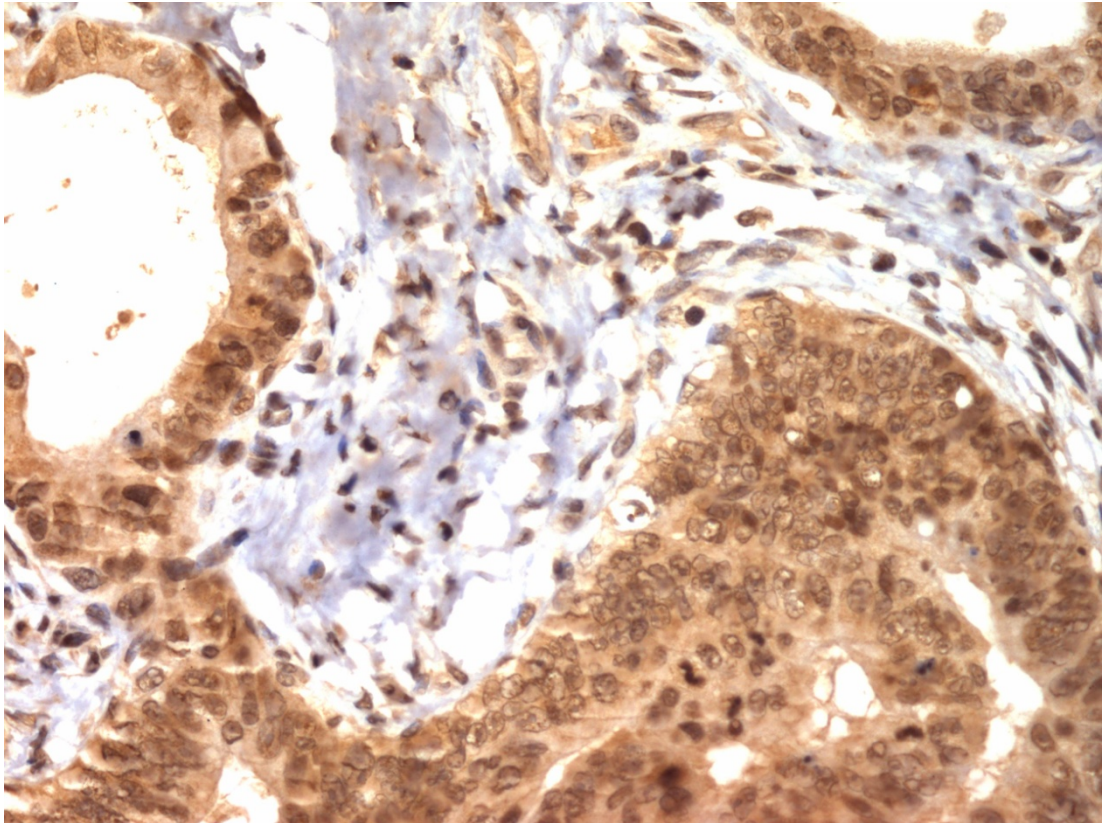
Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador FAK



Fotomicrografia em aumento de 400X, evidenciando positividade do marcador FAK



Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando negatividade do marcador Pi3K



Fotomicrografia em aumento de 400x, evidenciando positividade (3+) do marcador Pi3K