



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
Departamento de Medicina

**Análisis de la relación entre el sistema renina-
angiotensina y la respuesta al tratamiento con
antiangiogénicos en pacientes con cáncer colorrectal y
cáncer de mama avanzado.**

Trabajo presentado por Diana Moreno Muñoz, licenciada en Medicina, para optar al
grado de Doctor.

Directores de tesis: Enrique Aranda Aguilar, Juan Rafael De la Haba Rodríguez.

Programa de doctorado RD 99/2011. Biomedicina.

Línea de investigación: Nuevas terapias en cáncer.

Fdo.: Diana Moreno Muñoz
Córdoba, a 10 de abril de 2018

TITULO: ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON
ANTIANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON CÁNCER
COLORRECTAL Y CÁNCER DE MAMA AVANZADO

AUTOR: *Diana Moreno Muñoz*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ANTIANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL Y CÁNCER DE MAMA AVANZADO

DOCTORANDO: DIANA MORENO MUÑOZ

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS: D. ENRIQUE ARANDA AGUILAR, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y D. JUAN RAFAEL DE LA HABA RODRÍGUEZ, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado “ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ANTIANGIOGÉNICOS EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL Y CÁNCER DE MAMA AVANZADO” ha sido realizado por Dña. Diana Moreno Muñoz, bajo nuestra dirección, en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), dentro del grupo GC06: Nuevas terapias en cáncer. Este trabajo ha conseguido un nivel científico de suficiente relevancia como para derivar en la publicación de un artículo en revista internacional en Q1 de su categoría (*Moreno-Muñoz D, de la Haba-Rodríguez JR, Conde F, López-Sánchez AV, Hernández V, Martínez A, Villar C, Gómez-España A, Porras I, Rodríguez-Ariza A, Aranda E. Genetic variants in the renin-angiotensin system predict response to bevacizumab in cancer patients. European Journal of Clinical Investigation 2015;45(12):1325-1332*) con un índice de impacto de 2.687.

A nuestro juicio reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 10 de abril de 2018

Firma de los directores

Fdo.: Dr. Prof. Enrique Aranda Aguilar

Fdo.: Dr. Juan R. de la Haba Rodríguez

Agradecimientos

Son muchas las personas que de una manera u otra han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis, al Dr. Enrique Aranda y el Dr. Juan De la Haba, por transmitirme la inquietud por la investigación, darme la oportunidad de aventurarme en este proyecto y guiarme en todo momento, no sólo durante la tesis sino a lo largo de mi formación como residente. Sin sus ideas y su dedicación hubiera sido imposible.

Gracias a todo el equipo del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), particularmente al Dr. Antonio Rodríguez, al Dr. Francisco Conde, a la Dra. Laura López, a la Dra. Araceli Valverde y a Vanessa Hernández, por su participación en el desarrollo experimental y gran aportación en todo este trabajo.

Gracias al Departamento de Análisis Clínicos y Genética Molecular. Gracias al Dr. Martínez, por su colaboración y asesoramiento. Gracias a Ángeles Díaz y a la Dra. Gema Varo por su importante contribución a esta tesis.

Gracias al Dr. Carlos Villar, del Departamento de Anatomía Patológica por su disponibilidad e implicación en este proyecto.

Gracias a todo el equipo de la Unidad de Investigación clínica de cáncer de mama del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) por acogerme y enseñarme tanto durante mi rotación con ellos. Gracias al jefe de unidad, el Dr. Miguel Ángel Quintela, por su respaldo y hacer posible que el modelo animal se llevara a cabo. Gracias especialmente a la Dra. Paloma Navarro y a la Dra. Silvana Mourón porque sin ellas no se habría conseguido.

Gracias a mis compañeros del Servicio de Oncología Médica. Gracias a los adjuntos, no sólo por ayudarme en la inclusión de pacientes, sino por permitirme aprender de ellos. Gracias a mis compañeros de residencia por las horas compartidas y soporte en la distancia.

Gracias a Eulàlia Grifol, responsable de la biblioteca del Hospital Universitario Fundación de Alcorcón (HUFA), por su inestimable ayuda en referenciar la bibliografía de este trabajo. Gracias también a Elia Pérez, responsable del Apoyo Metodológico y Análisis de Datos de HUFA, por responder a mis dudas estadísticas. Gracias a ambas por su disponibilidad.

Gracias a mi familia y amigos, por su aliento y comprensión. Gracias a mis padres, por la educación que me han dado y enseñarme que con esfuerzo todo se consigue. Gracias a mis hermanos mayores, Samuel y Aida, que siempre han sido mi ejemplo a seguir, y en especial a tí Jose, por tu paciencia infinita, tu ayuda y apoyo incondicional.

Por último y, principalmente, gracias a todos los pacientes que han participado de manera altruista en este estudio.

A todos vosotros va dedicada esta tesis.

ÍNDICE

1.RESUMEN	11
2.INTRODUCCIÓN.....	17
2.1 Generalidades del cáncer colorrectal metastásico (CCRm): Epidemiología, diagnóstico y tratamiento.....	19
2.2 Generalidades del cáncer de mama metastásico (CMm): Epidemiología, diagnóstico y tratamiento.....	26
2.3 Angiogénesis y factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , VEGF).....	32
2.4 Bevacizumab e hipertensión arterial (HTA).....	37
2.5 HTA como factor pronóstico y predictivo de respuesta a bevacizumab	42
2.6 VEGF circulante como factor pronóstico y predictivo de respuesta a bevacizumab.....	46
2.7 Polimorfismos de VEGF y sus receptores en línea germinal y respuesta a bevacizumab.....	52
2.8 Sistema renina-angiotensina (SRA).....	57
2.8.1 Generalidades.....	57
2.8.2 SRA y cáncer.....	60
2.8.3 Polimorfismos del SRA.....	65
- Polimorfismo de inserción/delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)	65
- Polimorfismo A1166C del gen del receptor de angiotensina II tipo 1 (AGTR-1).....	67
- Polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno (AGT)	68
2.9 Otros polimorfismos relacionados con la HTA	70
2.9.1 Polimorfismos de los receptores β -adrenérgicos.....	70
2.9.2 Polimorfismos de genes relacionados con el manejo renal de sodio	71
2.9.3 Polimorfismos del gen de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS).....	72
3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
4.PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODO	79
4.1 Pacientes	81
4.2 Material.....	81
4.3 Método	82
4.3.1 Experimentación clínica.....	82
4.3.1.1. Genotipado.....	82
4.3.1.2. ELISA.....	82
4.3.1.3. Análisis estadístico	83

4.3.2 Experimentación preclínica.....	88
4.3.2.1 Sobreexpresión del gen AGTR1 en células MCF-7	88
4.3.2.2 Modelo de xenoinjerto murino	88
4.3.2.3 Modelo transgénico murino MMTV-PyMT	89
5.RESULTADOS	91
5.1 Características de los pacientes.....	93
5.2 Análisis temporal	102
5.3 Estudio de los polimorfismos del SRA.....	105
5.3.1 Relación entre los diferentes polimorfismos y la respuesta al tratamiento antiangiogénico	105
5.3.2 Relación entre los diferentes polimorfismos y los niveles plasmáticos de VEGF-A y ECA.....	114
5.3.3 Relación entre los diferentes polimorfismos y el desarrollo de HTA durante el tratamiento antiangiogénico	117
5.4 Relación entre los niveles plasmáticos de ECA y la respuesta al tratamiento antiangiogénico.....	117
5.5 Relación entre los niveles plasmáticos de VEGF-A y la respuesta al tratamiento antiangiogénico	119
5.6 Relación entre el desarrollo de HTA y la respuesta al tratamiento antiangiogénico	120
5.7 Relación entre desarrollo de HTA y niveles de VEGF-A y ECA en plasma	123
5.8 Modelo experimental	124
6.DISCUSIÓN.....	129
7.CONCLUSIONES.....	147
8.ABREVIATURAS	151
9.BIBLIOGRAFÍA.....	155
10.PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS.....	177
11.ANEXOS	189
11.1 ANEXO 1: Acta de la Comisión de Ética e Investigación sanitaria.....	191
11.2 ANEXO 2: Consentimiento informado	192
11.3 ANEXO 3: Documento de solicitud extracción de muestra de ADN.....	194
11.4 ANEXO 4: Criterios RECIST 1.1.....	195
11.5 ANEXO 5: Sistema de estadiaje del Cáncer colorrectal AJCC TNM (2010) ..	196
11.6 ANEXO 6: Sistema de estadiaje del Cáncer de Mama AJCC TNM (2010)	198

1.RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Actualmente no disponemos de marcadores predictivos de respuesta al tratamiento antiangiogénico en pacientes con cáncer, aunque el desarrollo de hipertensión arterial (HTA) secundaria se ha asociado con una evolución mejor de la enfermedad. Nuestro objetivo es explorar la relevancia clínica de polimorfismos genéticos de diferentes componentes del Sistema Renina Angiotensina (SRA) así como de otros genes relacionados con la HTA y la vía angiogénica en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama avanzado.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODO: Se incluyeron 232 pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal o mama avanzado tratados con bevacizumab. Se aisló ADN genómico a partir de sangre periférica y se realizó el genotipado mediante PCR en tiempo real de los siguientes polimorfismos: polimorfismos del SRA [AGTR1 A1166C (rs5186), AGT M235T (rs699), ECA I/D (rs1799752 o rs4646994)]; polimorfismos de otros genes relacionados con la HTA como es el caso de los receptores adrenérgicos [ADRB1 Gly389Arg (rs1801253), ADRB2 Arg16Gly (rs1042713), ADRB2 Gln27Glu (rs1042714), ADRB3 Trp64Arg (rs4994)], manejo renal de sodio [GNB3 825 C>T (rs5443)] y sintasa de óxido nítrico endotelial [NOS3 -786T>C (rs2070744), NOS3 Glu298Asp (rs1799983)]; así como polimorfismos relacionados con la vía del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [VEGF -2578C/A (rs699947), VEGF -1498 C/T (rs833061), VEGFR-1 (o FLT; rs9582036)]. Asimismo, se determinaron los niveles en plasma de VEGF y de enzima convertidora de angiotensina (ECA) usando los correspondientes kits de ELISA. La actividad antitumoral de bevacizumab se ensayó en ratones xenoinjertados ortotópicamente con células de cáncer de mama que sobreexpresaron AGTR1. Por último, se testó el crecimiento tumoral y la supervivencia de ratones genéticamente modificados para desarrollar cáncer de mama (ratones *MMTV-PyMT*) tras la adición de angiotensina II (AT-II) y un anti-VEGF murino (B20).

RESULTADOS: En cáncer de mama avanzado (n=83): el genotipo IN/IN de ECA se asoció con una tasa de progresión mayor en comparación con IN/DEL y DEL/DEL (50 vs 11.8%; p=0.02) y con un tiempo al fallo de tratamiento (TFT) menor [mediana de 2.87 meses (IC 95% 0-6.56) vs 9.60 meses (IC 95% 6.88-12.32); p=0.003]. El genotipo CT del AGT M235T se relacionó con un TFT menor [mediana de 7.47 meses (IC 95% 5.45-9.48) en CT vs 9.60 meses (IC 95% 6.17-13.03) en TT y 16.80 meses (IC 95% 15.26-18.34) en CC; p=0.03] y supervivencia global (SG) menor [mediana de 20.63 meses (IC

95% 12.03-29.24) en CT vs 30.67 meses (IC 95% 18.35-42.99) en TT vs no alcanzada en CC; p=0.04]. El genotipo CC de VEGFR-1 se vinculó con una SG menor [mediana de 13.67 meses (IC 95% 0.00-31.39) en CC vs 22.50 meses (IC 95% 7.05-37.95) en AA vs 48.57 meses (IC 95% 43.63-53.50) en CA; p=0.005]. El genotipo CT de NOS3 786T>C se asoció con una SG menor [mediana de 19.47 meses (IC 95% 15.14-23.79) en CT vs 48.57 meses (IC 95% 0-97.71) en TT sin alcanzar la mediana en CC; p=0.034]. Niveles plasmáticos de VEGF superiores se correlacionaron con una mayor tasa de respuestas globales [TRG] (p=0.02) y con una disminución del 20% del riesgo de fallar al tratamiento (p=0.002). En cáncer colorrectal avanzado (n=149): el genotipo AA de AGTR1 A1166C se relacionó con una tasa de progresión mayor en comparación con AC y CC (13.7 vs 4.3%; p=0.05). El genotipo AA de VEGF -2578 C/A se asoció con más progresiones en comparación con CC y AC (24.2 vs 8.8 y 3.9 % respectivamente; p=0.006), con un TFT menor [mediana de 8.30 meses (IC 95% 5.80-10.79) en AA vs 10.50 meses (IC 95% 8.35-12.65) en AC vs 17.50 meses (IC 95% 9.34-25.66) en CC; p=0.003] y SG menor [mediana de 23.20 meses (IC 95% 18.02-28.37) en AA vs 33.70 meses (IC 95% 23.99-43.40) en AC vs 40.47 meses (IC 95% 26.59-54.34) en CC; p=0.05]. El genotipo GT del polimorfismo NOS3 Glu298Asp se vinculó con una tasa de progresión mayor en comparación con los genotipos homocigóticos (15.6 vs 0%; p=0.05) y con una SG menor [mediana de 25.97 meses (IC 95% 7.09-44.85) en GT vs 41.30 meses (IC 95% 28.49-54.10) en GG, sin ser alcanzada en TT; p=0.01]. Considerando la muestra en su totalidad, el genotipo DEL/DEL de ECA se asoció con niveles superiores de ECA en plasma pero sin alcanzar la significación estadística (p>0.05). Además, niveles de ECA altos se correlacionaron con más TRG (p=0.05). Observamos que pacientes con niveles de ECA \geq 135 ng/mL y genotipos DEL/DEL o IN/DEL presentaron un TFT mayor que aquellos con niveles de ECA < 135 ng/mL y genotipo IN/IN [mediana de 13.30 meses (IC 95% 9.05-17.55) vs 7.77 meses (IC 95% 1.65-13.88); p=0.04]. In vivo, los experimentos demostraron una actividad antitumoral de anti-VEGF significativamente mayor en tumores de cáncer de mama con sobreexpresión de AGTR1, así como tras la adición de AT-II.

CONCLUSIONES: Una mayor actividad del eje ECA-AT-II-AGTR1 se asocia con una respuesta mejor a bevacizumab, lo que sugiere que el SRA, además de otros polimorfismos relacionados con la HTA y con la vía de VEGF, podría ser una fuente de posibles marcadores predictivos de respuesta al tratamiento antiangiogénico. Se necesitan más estudios que confirmen estos hallazgos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Predictive biomarkers of benefit from angiogenesis inhibition in cancer are lacking but response to anti-angiogenic drugs is associated with development of hypertension secondary to treatment. Therefore, this study explored the clinical relevance of genetic polymorphisms of the renin–angiotensin system (RAS), as well as polymorphisms of other genes related to hypertension and angiogenic pathway in advanced colorectal or breast cancer patients.

MATERIAL AND METHODS: Genomic DNA was isolated from peripheral blood from 232 metastatic colorectal or breast cancer patients treated with bevacizumab. The following genetic polymorphisms were genotyped using RT-PCR: genetic polymorphisms of the RAS [A1166C (rs5186), AGT M235T (rs699), ACE I/D (rs1799752 or rs4646994)]; genetic polymorphisms of other genes related to hypertension such as adrenergic receptors [ADRB1 Gly389Arg (rs1801253), ADRB2 Arg16Gly (rs1042713), ADRB2 Gln27Glu (rs1042714), ADRB3 Trp64Arg (rs4994)], renal sodium management [GNB3 825 C>T (rs5443)] and endothelial nitric oxide synthase [NOS3 -786T>C (rs2070744), NOS3 Glu298Asp (rs1799983)]; genetic polymorphisms related to the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway [VEGF -2578 C/A (rs699947), VEGF -1498 C/T (rs833061), VEGFR-1 (or FLT; rs9582036)]. Circulating VEGF and angiotensin converting enzyme (ACE) levels were analysed using ELISA kits. The antitumoral activity of bevacizumab was assayed in mice orthotopically xenografted with AGTR1-overexpressing breast cancer cells. Finally, the tumor growth and the survival of genetically engineered mice for breast cancer (MMTV-PyMT mice) after the addition of angiotensin II (AT-II) and a murine anti-VEGF antibody (B20) were tested.

RESULTS: In advanced breast cancer patients (n=83): the ACE IN/IN genotype was associated with a higher rate of disease progression compared with IN/DEL and DEL/DEL (50 vs 11.8%; p=0.02) and with shorter time to treatment failure (TTF) [median of 2.87 months (95% CI 0-6.56) vs 9.60 months (95% CI 6.88-12.32); p=0.003]. The AGT M235T CT genotype was associated with shorter TTF [median of 7.47 months (95% CI 5.45-9.48) in CT vs 9.60 months (95% CI 6.17-13.03) in TT and 16.80 months (95% CI 15.26 -18.34) in CC; p=0.03] and overall survival (OS) [median of 20.63 months (95% CI 12.03-29.24) in CT vs 30.67 months (95% CI 18.35-42.99) in TT vs not reached in CC; p=0.04]. The VEGFR-1 CC genotype was associated with shorter OS [median of 13.67 months (95% CI 0.00-31.39) in CC vs 22.50 months (95% CI 7.05-37.95) in AA

vs 48.57 months (95% CI 43.63-53.50) in CA; p=0.005]. The NOS3 786 CT genotype (rs2070744) was associated with shorter OS [median of 19.47 months (95% CI 15.14-23.79) in CT vs 48.57 months (95% CI 0-97.71) in TT vs not reached in CC; p=0.034]. Higher plasma levels of VEGF were correlated with a higher overall response rate (ORR) (p=0.02) and with a 20% decrease in the risk of failing treatment (p=0.002). In advanced colorectal cancer patients (n=149): the AGTR1 1166 AA genotype was associated with a higher progression rate compared to AC and CC (13.7 vs. 4.3%; p=0.05). The VEGF -2578 AA genotype (rs699947) was associated with more progressions compared to CC and AC (24.2 vs. 8.8 and 3.9% respectively; p=0.006), with shorter TTF [median of 8.30 months (95% CI 5.80 -10.79) in AA vs 10.50 months (95% CI 8.35-12.65) in AC vs. 17.50 months (95% CI 9.34-25.66) in CC; p=0.003] and OS [median of 23.20 months (95% CI 18.02-28.37) in AA vs 33.70 months (95% CI 23.99-43.40) in AC vs 40.47 months (95% CI 26.59-54.34) in CC; p=0.05]. The Glu298Asp NOS3 GT genotype was associated with a higher progression rate compared to homozygous genotypes (15.6 vs 0%; p=0.05) and with shorter OS (median of 25.97 months (95% CI 7.09- 44.85) in GT vs 41.30 months (95% CI 28.49-54.10) in GG vs not reached in TT; p=0.01]. Considering all patients, the DEL/DEL genotype was associated with higher plasma ACE levels, but the difference was not statistically significant (p>0.05). Besides, higher circulating ACE levels were found to be associated with a higher ORR (p=0.05). We observed that patients with ACE levels \geq 135 ng/mL and DEL/DEL or IN/DEL genotypes presented higher TTF compared to patients with ACE levels <135 ng/mL and IN/IN genotype [median of 13.30 months (95% CI 9.05-17.55) vs 7.77 months (95% CI 1.65-13.88); p=0.04]. Moreover, in vivo experiments showed a significantly higher antitumoral activity of bevacizumab in tumours derived from AGTR1-overexpressing breast cancer cells, as well as after addition of AT-II.

CONCLUSIONS: A higher activity of ACE-AT-II-AGTR1 axis is associated with a better response to bevacizumab, suggesting that the SRA, in addition to other polymorphisms related to hypertension and VEGF pathway, could be an important source of possible predictive markers of response to antiangiogenic treatment. More studies are needed to confirm these findings.

2.INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades del cáncer colorrectal metastásico (CCRm): Epidemiología, diagnóstico y tratamiento

A nivel mundial, el cáncer colorrectal representa la tercera neoplasia más frecuente en hombres y la segunda en mujeres, con más de 1.4 millones de casos nuevos y un total de 693933 muertes estimadas por esta patología en 2012¹. En España, es la tercera neoplasia más frecuente pero constituye la segunda causa de muerte por cáncer, con 32240 casos nuevos al año causando 14700 muertes².

Aproximadamente, un 20% de los pacientes presentan metástasis al diagnóstico con afectación hepática exclusivamente en un 50 % de los casos, aunque sólo un 10-20% es inicialmente resecable. En estadios localizados, cabe señalar que un 25-50% de los pacientes desarrollarán metástasis durante la evolución de la enfermedad³.

Con respecto al diagnóstico debe realizarse: anamnesis y exploración física completas, puesto que el estado general (performance status) del paciente se considera factor pronóstico (aquél que informa de la evolución clínica de la enfermedad) y factor predictivo (aquél que informa de la probabilidad de respuesta tumoral a un tratamiento); colonoscopia completa para detectar posibles lesiones sincrónicas colorrectales y confirmar el diagnóstico mediante toma de biopsia. Con el estudio anatomopatológico se determinará el tipo histológico, el grado de diferenciación tumoral, así como el estado mutacional de los genes KRAS y NRAS (codones 12, 13, 59, 61, 117 y 146 de exones 2, 3 y 4 de KRAS y de NRAS) en pacientes metastásicos candidatos a terapia dirigida contra el receptor del factor epidérmico de crecimiento, *epidermal growth factor receptor* (EGFR), puesto que la presencia de estas mutaciones han sido identificadas como biomarcadores de resistencia intrínseca de las células tumorales a fármacos dirigidos contra EGFR (cetuximab, panitumumab). Por ello, las agencias reguladoras restringen el uso de estos fármacos a los pacientes con CCRm sin mutación de KRAS ni NRAS, es decir, RAS wild type (RAS WT). Se ha descrito que la mutación en KRAS y NRAS aparece aproximadamente en el 40% y en el 3-5% de los casos respectivamente⁴. Cabe destacar a BRAF, que es el principal efector de KRAS formando parte de la vía de señalización MAPK/ERKs afectando a la división celular y a la diferenciación. La presencia de mutaciones del gen BRAF (presentes en el 8-12% de los casos de CCRm, siendo la más frecuente V600E) se considera un factor de mal pronóstico y su realización

se considera principalmente en los tumores RAS WT, al ser las mutaciones de RAS y BRAF mutuamente excluyentes (cuando uno de estos genes presenta una mutación el otro excepcionalmente está mutado)⁵. Existe evidencia de que la mutación de BRAF reduce la eficacia del tratamiento anti-EGFR⁴.

En el manejo del paciente con CCRm también es preciso realizar un análisis de sangre (que incluya hematiemetría, bioquímica con función hepática y renal, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa, antígeno carcinoembrionario (CEA)), así como estudio de extensión con tomografía computarizada (TC) de tórax, abdomen y pelvis. Actualmente, la tomografía por emisión de positrones (PET) no se incluye de forma sistemática en la estadificación inicial, pero sí se emplea cuando se prevea que pueda modificar la actitud terapéutica a seguir, es decir, si la enfermedad metastásica es o puede llegar a ser resecable para objetivar así una posible afectación extrahepática/pulmonar que excluya la cirugía. La resonancia magnética (RM) hepática con contraste puede considerarse en caso de afectación hepática potencialmente resecable⁶.

A la hora de decidir el esquema terapéutico en primera línea, la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) propuso clasificar al paciente dentro de uno de estos cuatro grupos, siendo crucial que la estrategia de tratamiento médico y quirúrgico, ya sea del tumor primario como de las metástasis, se planifique dentro de un comité multidisciplinar de tumores digestivos⁵:

- Grupo 0 (resecable): pacientes con metástasis hepáticas y/o pulmonares que pueden resecarse con márgenes libres (R0).
- Grupo 1 (potencialmente resecable): pacientes con metástasis hepáticas y/o pulmonares limitadas que no son resecables R0 de inicio, pero que pueden llegar a serlo tras respuesta a quimioterapia (QT) de conversión. Los pacientes han de ser capaces de tolerar la cirugía para pertenecer a los grupos 0 y 1.
- Grupo 2 (no resecable): pacientes con metástasis múltiples que presentan progresión rápida y/o síntomas relacionados con la enfermedad y/o riesgo de deterioro rápido. Los pacientes deben poder tolerar una QT intensiva para pertenecer a los grupos 1 y 2.
- Grupo 3 (no resecable): pacientes que nunca tendrán opción de resección, sin síntomas mayores o riesgo de deterioro rápido o que tienen una comorbilidad grave que impide una QT (frágiles).

En la última actualización los pacientes se clasifican como “fit” o “unfit”. Dentro de los pacientes “fit” se diferencian dos grupos:

- grupo 1: pacientes en los que el tratamiento intensivo está indicado con el objetivo de la citorreducción y la conversión a enfermedad resecable o ante carga tumoral alta que necesite una respuesta tumoral rápida para mejorar los síntomas del paciente.
- grupo 2: pacientes asintomáticos con enfermedad irresecable en los que el tratamiento intensivo no es necesario y el objetivo es el control de la enfermedad.

Los pacientes unfit serían candidatos a tratamiento de soporte para lograr un control sintomático adecuado.

El tratamiento de los pacientes con CCRm no resecable está evolucionando rápidamente. El objetivo es prolongar la supervivencia, mejorar los síntomas relacionados con el tumor, detener la progresión de la enfermedad y/o mejorar la calidad de vida. Considerar el tratamiento como continuo es un aspecto esencial, ya que la administración secuencial de distintos fármacos o sus combinaciones en distintas líneas de tratamiento aumentan la supervivencia. Así, en los últimos años ha mejorado la mediana de supervivencia global (SG), alcanzando los 30 meses⁴.

Existen diversos fármacos activos en el tratamiento de la enfermedad avanzada: 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, raltitrexed, irinotecan, oxaliplatino, trifluridina/tipiracil hidrocloreuro (conocido como TAS 102), fármacos biológicos dirigidos al factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), como bevacizumab y aflibercept, anticuerpos dirigidos al ya mencionado EGFR, como cetuximab o panitumumab o dirigidos a múltiples quinasas (VEGFR, PDGFR, FGFR, TIE2, KIT, RET, RAF) como regorafenib. Estos agentes pueden utilizarse en diferentes combinaciones y secuencias, debiendo individualizarse en función de la biología tumoral (incluyendo estado mutacional de RAS y BRAF), sintomatología, objetivo del tratamiento (intención paliativa o posibilidad de rescate quirúrgico; que el paciente presente síntomas o complicaciones secundarias al tumor vs que la enfermedad curse de manera asintomática), perfil de toxicidad de los fármacos, estado general del paciente, comorbilidad asociada así como sus preferencias. Valorando también, a lo largo

de la evolución de la enfermedad, los esquemas previos recibidos (efectos secundarios producidos así como respuesta obtenida tras los mismos).

Teniendo en cuenta consideraciones previas, la primera línea de QT en los pacientes candidatos a tratamiento intensivo incluye dos fármacos de QT y un agente biológico^{5,6}. La elección del doblete de QT se hará sobre un esquema basado en combinación de fluoropirimidinas con oxaliplatino⁷ o irinotecan⁸. Combinaciones con oxaliplatino (FOLFOX/XELOX) e irinotecan (FOLFIRI/XELIRI) han mostrado una actividad similar con un perfil de toxicidad diferente [mientras que irinotecan se asocia con neutropenia, alopecia y toxicidad gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea y mucositis), oxaliplatino se asocia con neutropenia, trombocitopenia, diarrea y neuropatía sensorial, que es la principal toxicidad limitante de dosis]⁶ (ver tabla 1).

Nombre	Fármacos
FOLFOX	5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina (LV) y oxaliplatino
XELOX	Capecitabina y oxaliplatino
FOLFIRI	5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina (LV) e irinotecan
XELIRI	Capecitabina e irinotecan
FOLFOXIRI	5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina (LV), oxaliplatino e irinotecan

Tabla 1. Combinaciones de quimioterapia. Se indica el nombre del esquema así como los componentes de los que consta la terapia combinada.

La asociación de anticuerpo monoclonal en primera línea (bevacizumab (anti-VEGF) y cetuximab y panitumumab (anti-EGFR)) ha demostrado mejorar los resultados clínicos. La elección de uno u otro depende fundamentalmente del estado mutacional de RAS.

En la población RAS WT, la asociación de cetuximab a FOLFIRI mejora la SG, supervivencia libre de progresión (SLP) y tasa de respuestas (TR)⁹. Asimismo, la adición de cetuximab a FOLFOX mejora la SLP y TR¹⁰. Se han observado resultados similares con beneficio en SG y SLP con la combinación panitumumab-FOLFOX¹¹. Los ensayos clínicos aleatorizados también han demostrado que la asociación de bevacizumab a QT mejora la SLP y/o SG en este escenario. El estudio pivotal de Hurwitz en 2004 supuso la primera evidencia en este contexto al demostrar que bevacizumab, en comparación con placebo, añadido a un esquema de irinotecan, 5-FU en bolo y leucovorin, aumenta la SLP, la TR y la SG¹². Bevacizumab también ha demostrado beneficio en combinación con QT

basada en oxaliplatino en comparación con placebo en primera línea prolongando la SLP, aunque la TR fue similar y el beneficio en SG no alcanzó la significación estadística¹³.

Se ha comparado directamente la asociación de un doblete de QT con anti-EGFR vs bevacizumab en primera línea de pacientes con CCRm RAS WT mediante un fase II y dos estudios fase III. El estudio fase II comparó FOLFOX-panitumumab vs FOLFOX-bevacizumab (estudio PEAK), donde, a pesar de observarse una SLP (objetivo primario) similar en ambos brazos, se encontraron diferencias en términos de SG en la población RAS WT a favor de la rama con panitumumab¹⁴. El estudio FIRE-3 comparó FOLFIRI-cetuximab vs FOLFIRI-bevacizumab sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en la tasa de respuestas objetivas (objetivo primario) ni en SLP, pero sí en términos de SG a favor del anti-EGFR¹⁵. Un análisis posterior que incluyó una revisión radiológica centralizada observó más TR y más reducciones rápidas del tamaño tumoral en el brazo de cetuximab¹⁶. Ante los resultados de estos dos estudios, se puso en marcha un segundo estudio fase III (estudio CALGB 80405) que comparó el régimen de QT elegido por el investigador (FOLFOX/FOLFIRI) asociado a cetuximab vs bevacizumab sin evidenciar diferencias en SG (objetivo primario), SLP ni TR¹⁷. Un metaanálisis de los tres estudios mostró un aumento en TR y SG a favor de la combinación con anti-EGFR en comparación con bevacizumab¹⁸. Por tanto, no disponemos de una evidencia clara de superioridad de la combinación con anti-EGFR en comparación con anti-VEGF en primera línea en CCRm RAS WT. Las guías clínicas sugieren elegir un anti-EGFR en caso de presencia de síntomas debidos al tumor o enfermedad biológicamente agresiva que precise una respuesta rápida, siendo preferible un anti-VEGF en el resto de casos por su mejor tolerancia, lo que permite al paciente recibir más líneas de tratamiento⁶.

Un aspecto que cada vez está cobrando mayor relevancia, es que la localización del tumor primario pueda comportarse como factor pronóstico y predictivo de respuesta a los anti-EGFR. La mayor evidencia al respecto viene del estudio CALGB 80405 previamente mencionado, donde se observó que los pacientes con tumores KRAS WT originados en el lado derecho (es decir, en el trayecto del colon comprendido entre el ciego y el ángulo hepático) presentaban una SG mayor si eran tratados con bevacizumab en lugar de con cetuximab, mientras que aquéllos originados en el lado izquierdo (es decir, en la zona del colon que discurre entre ángulo esplénico y el recto) tenían una SG mayor si recibían tratamiento con cetuximab en comparación con bevacizumab¹⁹.

Los esquemas estándares de combinación de QT basada en irinotecan o en oxaliplatino más bevacizumab se compararon en dos ensayos fase III con el mismo tratamiento asociado a un anticuerpo anti-EGFR (cetuximab²⁰ o panitumumab²¹) de forma concomitante, pero ninguno de los dos estudios evidenció beneficio al añadir un anti-EGFR a QT más bevacizumab, por lo que no se recomienda su administración conjunta.

En pacientes con CCRm RAS mutado candidatos a tratamiento intensivo se recomienda doblete de QT con bevacizumab⁶.

El triplete citotóxico FOLFOXIRI con²² o sin²³ bevacizumab se reservaría para pacientes seleccionados en los que el objetivo sea la citorreducción tras haber demostrado aumentar la TR y supervivencia en comparación con FOLFIRI con o sin bevacizumab respectivamente, a costa de una mayor toxicidad^{5,6}.

En pacientes frágiles puede considerarse la monoterapia con fluoropirimidinas valorando la adición de bevacizumab dado que así aumentan la TR y la SLP^{24,25}. En caso de contraindicación para fluoropirimidinas (enfermedad vascular o déficit de la enzima que participa en el catabolismo de las fluoropirimidinas, la dihidropirimidina deshidrogenasa) puede emplearse irinotecan o raltitrexed en monoterapia. Cetuximab y panitumumab también han mostrado actividad en monoterapia en primera línea en estudios fase II^{26,27}.

Las segunda y sucesivas líneas dependerán de los tratamientos previos administrados: en aquéllos que progresen a un esquema basado en oxaliplatino, se planteará un régimen basado en irinotecan y viceversa (siempre que no exista contraindicación)^{5,6}.

En cuanto al tratamiento dirigido, se ha observado que el mantenimiento de bevacizumab (tras haber sido empleado en primera línea) junto con una QT de segunda línea mejora la SG y la SLP en comparación con la QT sola²⁸. En caso de no haberse utilizado inicialmente, se puede considerar su asociación en segunda línea, al haber demostrado, en combinación con FOLFOX, aumento de TR y SG en comparación con QT-placebo²⁹. Aflibercept es otro antiangiogénico que actúa uniéndose a VEGF-A y B y al factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor*, PIGF) y ha demostrado aumentar la SG, SLP y TR en segunda línea en combinación con FOLFIRI en comparación con FOLFIRI-placebo tras fracaso a un régimen con oxaliplatino (pudiendo haber recibido

también bevacizumab)³⁰. Además, en este escenario, es decir, en combinación con FOLFIRI en segunda línea a la progresión de QT basada en oxaliplatino y bevacizumab, se ha analizado la eficacia de un tercer antiangiogénico, ramucirumab, que bloquea a VEGFR-2, mostrando beneficio en SG en comparación con FOLFIRI-placebo³¹.

En los pacientes con CCRm RAS WT, cetuximab y panitumumab pueden añadirse en segunda línea en combinación con QT si no se han usado en primera línea y, sobre todo, si el objetivo del tratamiento es la respuesta tumoral^{32,33}. También pueden usarse en monoterapia en tercera línea o líneas posteriores en pacientes que no los hayan recibido previamente puesto que han demostrado mejorar la SLP (panitumumab y cetuximab) y SG (cetuximab) en comparación con el tratamiento de soporte^{34,35}.

En pacientes politratados que son candidatos a continuar con tratamiento y no tienen factores de riesgo cardiovasculares, puede plantearse regorafenib, que ha mostrado aumento de SG y de SLP en comparación con tratamiento de soporte³⁶. Otra alternativa es el tratamiento con TAS 102 al haberse constatado que aumenta la SG en comparación con placebo³⁷, teniendo en cuenta que si el estado general empeora, el tratamiento de soporte con control sintomático es la opción más adecuada.

Un mayor conocimiento de la célula tumoral y de la vigilancia inmune ha dado lugar a grandes avances que se están estudiando en muchos tipos de tumores actualmente. Cabe destacar el papel de los “checkpoint inhibitors” o moléculas de punto de control inmune, en concreto CTLA-4 (*cytotoxic T cell lymphocyte associated protein 4*) y PD-1 (*programmed death receptor 1*) que, en términos generales, pueden considerarse un “freno fisiológico” en la activación de los linfocitos T. Se ha demostrado que su bloqueo estimula la respuesta antitumoral y mejora la supervivencia en pacientes con cáncer avanzado³⁸. En concreto en pacientes con CCRm que han fracasado a tratamiento previo, pembrolizumab (un anti PD-1) ha demostrado en un estudio fase II aumento en TR y SLP en el subgrupo de pacientes que tenían tumores con déficit en los genes implicados en la reparación del ADN³⁹. Dicha deficiencia provoca un gran número de mutaciones somáticas, especialmente en regiones repetidas de ADN conocidas como microsatélites. La acumulación de mutaciones en estas regiones del genoma se denomina inestabilidad de microsatélites (IMS), lo cual aparece en el 5-15% de los pacientes con CCRm, y parece ser la responsable de la susceptibilidad al bloqueo de PD-1³⁸. Así, se abre la puerta a la

inmunoterapia en el CCRm, apareciendo pembrolizumab como una alternativa en estos pacientes.

2.2 Generalidades del cáncer de mama metastásico (CMm): Epidemiología, diagnóstico y tratamiento

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la mujer representando el 29% del conjunto de neoplasias, siendo el cuarto en frecuencia considerando ambos sexos². En el varón es raro, contribuyendo a menos del 1% de los casos⁴⁰. A nivel mundial hay más de 1.7 millones de casos al año, habiendo fallecido 521907 mujeres en 2012¹. En España se diagnostican 26000 casos nuevos al año aproximadamente², de los cuales un 5-6% son metastásicos de inicio. Un 30% de las pacientes diagnosticadas en un estadio precoz presentarán recaída a distancia durante el seguimiento⁴¹. Con una supervivencia estimada del 25% a los 5 años y una mediana de 2-3 años⁴², en 2012, en nuestro país, fallecieron 6075 mujeres por esta causa².

Ante cualquier sospecha de diseminación metastásica, han de realizarse las pruebas necesarias para su confirmación: historia clínica y exploración física completas, analítica de sangre (con hemograma, función renal, perfil hepático, fosfatasa alcalina, calcio, CA 15.3 y CEA), y pruebas de imagen en función de la sospecha clínica: TC, RM, ecografía y/o gammagrafía ósea. Al igual que en cáncer colorrectal, la PET sólo se considerará en los casos de duda para completar el estudio de extensión. Se recomienda biopsia de la lesión metastásica para confirmar el diagnóstico y conocer así el fenotipo tumoral⁴³.

En las células del cáncer de mama se pueden encontrar receptores de estrógeno (RE) y receptores de progesterona (RProg). En caso de estar presentes (lo cual ocurre en el 70% de los casos aproximadamente), las células tumorales dependen, al menos parcialmente, de los estrógenos y las hormonas relacionadas para crecer. Se considera que la expresión de RE y/o RProg es un factor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento hormonal por lo que su determinación es crucial para ofrecer el tratamiento más adecuado⁴¹. Por otro lado, HER2 (gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*) es un receptor con actividad tirosin-quinasa, producto de la síntesis del protooncogen ERBB2, que se encuentra en la superficie de las células mamarias y que controla su crecimiento, por lo que su expresión anormal, que

aparece en el 20% de los casos, se asocia a procesos tumorales y a un pronóstico peor. HER2 se ha convertido en una importante diana terapéutica para la que se han desarrollado tratamientos específicos anti-HER2, por lo que su evaluación también es fundamental⁴¹.

Desde el año 2000, tras el trabajo de Perou y cols., el cáncer de mama se considera una enfermedad heterogénea, con diferentes subtipos que implican un pronóstico y planteamiento terapéutico diferentes. Propusieron una clasificación basada en perfiles de expresión génica diferenciando 5 grupos: Luminal A y B, HER2 positivo (HER2+), basal-like y normal-breast⁴⁴. Sin embargo, en la práctica clínica, el acceso a las plataformas genómicas es limitado y la estrategia terapéutica se basa en la determinación de RE, RProg, HER2 e índice de proliferación como el Ki67 por técnicas de inmunohistoquímica, estando todos ellos integrados en las guías de consenso ESMO⁴⁰ (ver tabla 2).

Subtipo intrínseco	Características clinicopatológicas
Luminal A	“Luminal A-like” RE positivo HER2 negativo Ki67 bajo RProg alto
Luminal B	“Luminal B-like (HER2 negativo)” RE positivo HER2 negativo Ki67 alto o RProg bajo “Luminal B-like (HER2 positivo)” RE positivo HER2 positivo cualquier Ki67 cualquier Rprog
HER2	“HER2 positivo (no luminal)” HER2 positivo RE y RProg negativos
Basal-like	“Triple negativo” RE y RProg negativos HER2 negativo

Tabla 2: Definiciones subrogadas de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama según las guías de práctica clínica de ESMO⁴⁰. RE: receptores de estrógenos; RProg: receptores de progesterona. *Si las células expresan al menos un 1% de RE deben considerarse RE positivo⁴⁵

En casos de recaída, también existe consenso sobre recomendar repetir la biopsia ante un posible cambio del fenotipo molecular de la metástasis con respecto al tumor primario, lo cual implicaría una estrategia terapéutica diferente⁴³.

Aproximadamente el 60-65% de los casos son tumores RH positivos y HER2 negativo, el 20-25% tumores HER2 positivos, y el 15-18% tumores triples negativos⁴⁶.

En líneas generales el tratamiento va a depender de la biología tumoral, líneas de tratamiento recibidas, intervalo libre de progresión así como de las preferencias y comorbilidad de la paciente.

En CMm hormonosensible HER2 negativo se recomienda hormonoterapia (HT) como primera opción, reservando la QT para los casos de enfermedad sintomática/agresiva que requieran una respuesta rápida. Hay que tener en cuenta que un tercio de los tumores tendrán resistencia primaria a la HT y casi todos ellos desarrollarán resistencia secundaria. En casos de resistencia hormonal, también se plantearía tratamiento con QT. La elección del tipo de HT se basa en el estado menstrual de la paciente, la comorbilidad asociada, los fármacos de HT recibidos previamente (ya sea en la enfermedad precoz como durante la fase avanzada) y el perfil de toxicidad, recomendándose emplear diferentes tratamientos de forma secuencial hasta que se desarrolle dicha resistencia hormonal⁴³. Son diferentes los fármacos de los que se disponen (ver tabla 3).

Mecanismo de acción	Clase	Fármaco
Bloqueo del RE	Modulador selectivo del RE	Tamoxifeno, toremifeno
Descenso del RE	Disminución selectiva del RE	Fulvestrant
Deprivación de estrógenos	Ablación ovárica Supresión ovárica con GnRH	Cirugía, radiación Goserelina, triptorelina, leuprolide
Inhibición de aromatasa (IA)	IA no esteroideo (3ª generación) IA esteroideo (3ª generación)	Anastrozol, letrozol Exemestano
Desconocido	Progestinas Estrógenos a dosis altas	Acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona Dietilestilbestrol (DES)

Tabla 3: Fármacos de hormonoterapia disponibles, clasificados atendiendo a su mecanismo de acción. Adaptado de guías de práctica clínica SEOM⁴³. IA: inhibidor de aromatasa; RE: receptor de estrógenos.

Un mecanismo conocido de resistencia a la HT es la señalización aberrante a través de la vía fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3k)-AKT-mTOR (mammalian target of ramamycin). El estudio BOLERO-2 demostró que everolimus (un inhibidor selectivo de mTOR) junto con exemestano (un inhibidor de la aromatasa esteroideo) aumentó la SLP (objetivo

principal) y la TR en mujeres postmenopáusicas que progresaron a tratamiento hormonal previo con inhibidores de aromatasas no esteroideo en comparación con exemestano solo, constituyendo una alternativa en estas pacientes⁴⁷.

El mayor avance en este escenario ha venido con el desarrollo de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), las cuales juegan un papel clave en la regulación del ciclo celular. La actividad de CDKs se regula a través de mecanismos de activación e inhibición, pero principalmente a través de la unión a ciclinas. La inhibición de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6, inhibiendo en consecuencia la fase del ciclo celular G1/S, han demostrado ser una estrategia que disminuye la resistencia a la HT. El primer inhibidor selectivo y reversible de CDK4 y CDK6 aprobado es palbociclib que ha demostrado aumentar la SLP en comparación con el tratamiento endocrino en la primera⁴⁸ y siguientes⁴⁹ líneas de tratamiento del CMm con RH positivos y HER2 negativo. Posteriormente han aparecido ribociclib y abemaciclib, éste último pendiente de aprobación por parte de las agencias reguladoras.

La QT es el tratamiento estándar para las pacientes con CMm triple negativo o con RH positivos que no son candidatas a HT por criterios de resistencia o agresividad. En general, se prefieren secuenciar esquemas en monoterapia, reservando la combinación para pacientes con tumores agresivos, sintomáticos o que amenacen la vida de la paciente. En primera línea tanto las antraciclinas como los taxanos son los agentes más activos y son la mejor opción aunque se hayan utilizado en neo/adyuvancia, siempre y cuando el intervalo libre de enfermedad no sea corto. En caso contrario, capecitabina y vinorelbina son opciones válidas en primera línea, valorando los platinos (sólos o en combinación) en el subtipo triple negativo⁴³.

El único agente biológico aprobado en pacientes con CMm HER2 negativo es bevacizumab.

Existen tres ensayos clínicos fase III que han analizado la eficacia y la seguridad de la combinación de bevacizumab con taxanos o capecitabina en primera línea de cáncer de mama localmente avanzado o metastásico HER2 negativo:

El estudio pivotal E2100 demostró que la adición de bevacizumab (10 mg/kg cada 15 días) a paclitaxel en comparación con paclitaxel en monoterapia aumentó la SLP y la tasa de respuestas objetivas sin mejora en la SG. Además, las pacientes del grupo con bevacizumab presentaron un aumento estadísticamente significativo de hipertensión arterial (HTA) grado 3-4, proteinuria, dolor de cabeza, isquemia cerebrovascular, infección, neuropatía y fatiga⁵⁰.

El estudio AVADO analizó 2 dosis diferentes de bevacizumab (7.5 y 15 mg/kg cada 3 semanas) en combinación con docetaxel, mostrando que la dosis de 15 mg/kg aumentó la SLP y la TR en comparación con placebo. Registraron más efectos adversos G3-4 (HTA, neutropenia) en los brazos con bevacizumab y docetaxel en comparación a docetaxel con placebo⁵¹.

La FDA (*Food and Drug Administration*), basándose en estos dos estudios aprobó la combinación de paclitaxel y bevacizumab en primera línea de CMm HER2 negativo en febrero de 2008 y ello fue lo que permitió el desarrollo de los siguientes estudios que se llevaron a cabo:

El estudio RIBBON-1 aleatorizó a 1237 pacientes a recibir QT con capecitabina, taxano (nab-paclitaxel o docetaxel) o combinaciones basadas en antraciclinas (con doxorubicina o epirubicina) en combinación con bevacizumab (15mg/kg cada 3 semanas) o placebo. La mediana de SLP fue superior para los brazos con bevacizumab de forma estadísticamente significativa sin diferencias en SG y sin registrar toxicidades no esperables (más casos de toxicidad grado 3-4 en los brazos con bevacizumab, principalmente HTA y proteinuria)⁵².

El estudio RIBBON-2 en segunda línea también mostró beneficio de la combinación de bevacizumab con QT estándar (capecitabina, taxano (paclitaxel, nab-paclitaxel, o docetaxel), gemcitabina, vinorelbina en términos de SLP a favor de la asociación de bevacizumab al tratamiento, sin diferencias en SG⁵³.

Según las recomendaciones de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), dado que ha demostrado aumentar la SLP y TR y su perfil de toxicidad es manejable, en ausencia de marcadores predictivos de respuesta, bevacizumab también podría considerarse en pacientes con CMm HER2 negativo⁴³.

En cuanto a la combinación del tratamiento antiangiogénico y el tratamiento anti-HER2 en mujeres con CMm HER2 positivo, el estudio AVEREL puso de manifiesto que la adición de bevacizumab a docetaxel-trastuzumab en primera línea no mejoró la SLP

(objetivo principal) ni la TR, y sí aportó una mayor toxicidad⁵⁴ por lo que no se recomienda el uso de bevacizumab en este contexto.

También se ha evaluado la asociación de bevacizumab con HT en primera línea de CMm hormonosensible HER2 negativo con la hipótesis de que el antiangiogénico puede retrasar la resistencia a HT. Por un lado, en el estudio LEA, no se observó beneficio estadísticamente significativo en SLP (objetivo primario) ni en SG⁵⁵. Sin embargo, en el estudio CALGB 40503 (Alliance), la adición de bevacizumab al tratamiento hormonal sí disminuyó el riesgo de progresión (objetivo primario) de forma significativa, a costa de un aumento de los efectos adversos ya conocidos (HTA, proteinuria), sin encontrar diferencias en SG⁵⁶.

Las segundas y posteriores líneas dependerán del estado general y la sintomatología de la paciente, pudiéndose optar por un retratamiento con taxanos o antraciclinas, o fármacos con diferente mecanismo de acción como vinorelbina, capecitabina, gemcitabina o eribulina⁴³, considerando siempre las preferencias de la paciente y tratamientos previos recibidos, sin existir una secuencia establecida.

La sobreexpresión del gen HER2 es un mecanismo bien conocido de resistencia endocrina y se asocia con un comportamiento tumoral más agresivo, si bien es cierto que, dada la incorporación de terapias dirigidas anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, TDM1, pertuzumab), el pronóstico de este subgrupo de pacientes ha mejorado por lo que se recomienda su administración de forma precoz⁴³. Su combinación con QT se asocia a un aumento de TR, SLP y SG tal y como demostró el estudio CLEOPATRA, por lo que en ausencia de contraindicación, la recomendación en primera línea en pacientes con CMm HER2 positivo es doble bloqueo anti-HER2 (trastuzumab, pertuzumab) en combinación con taxano⁵⁷.

Existe evidencia de que continuar con tratamiento anti-HER2 en líneas sucesivas tras progresión a primera línea aporta beneficio, siendo TDM-1 la opción preferida en segunda línea⁵⁸.

Aproximadamente el 50% de los tumores que expresan HER2, también expresan RH y se ha observado que la asociación de HT a tratamiento anti-HER2 mejora la SLP en

comparación con la HT sola, tal y como se vio en mujeres postmenopáusicas con la combinación letrozol-lapatinib⁵⁹ o anastrozol-trastuzumab⁶⁰ en primera línea, por lo que debe plantearse esta opción en caso de que la paciente no sea candidata a QT.

2.3 Angiogénesis y factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*)

La angiogénesis (del griego angeion que significa vaso y génesis que significa nacimiento) se define como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (a diferencia de la vasculogénesis, que hace referencia a la creación de vasos durante el desarrollo embrionario a partir de las células endoteliales precursoras). Se considera un aspecto esencial para el crecimiento tumoral más allá de los 2-3 mm³ para proporcionar así el aporte de nutrientes y oxígeno necesario, lo cual facilita la migración de las células tumorales y el desarrollo de metástasis^{61,62}.

De manera fisiológica, este fenómeno sucede durante la menstruación, la cicatrización de las heridas, la reparación ósea y la adaptación de los músculos al ejercicio, lo que indica que VEGF es necesario para la homeostasis de la vasculatura en el adulto⁶³.

En la angiogénesis participan diferentes vías moleculares, de entre las que destaca la familia de VEGF y sus receptores⁶⁴.

VEGF fue descubierto como un factor soluble derivado del tumor con efectos pleiotrópicos sobre la célula endotelial que incluyen migración e invasión de la membrana basal, proliferación y formación de fenestraciones⁶³, lo cual estimula el crecimiento de los vasos sanguíneos que nutren al tumor. Desde entonces, se han identificado 7 miembros de la familia de VEGF: VEGF-A (generalmente denominado VEGF), -B, -C, -D, -E y factor del crecimiento placentario (PIGF) 1 y 2. VEGF media su acción a través de los receptores de VEGF, de los cuales se conocen 3: VEGFR-1 (también llamado flt-1 [fms-like tyrosine kinase]), VEGFR-2 (KDR [Kinase insert Domain Receptor] o flk-1 [fetal liver kinase 1]); expresados ambos en las células endoteliales vasculares participando en la angiogénesis y VEGFR-3 (flt-4), que se expresa principalmente en las células endoteliales linfáticas y regula la linfangiogénesis^{63,65,66} (ver figura 1).

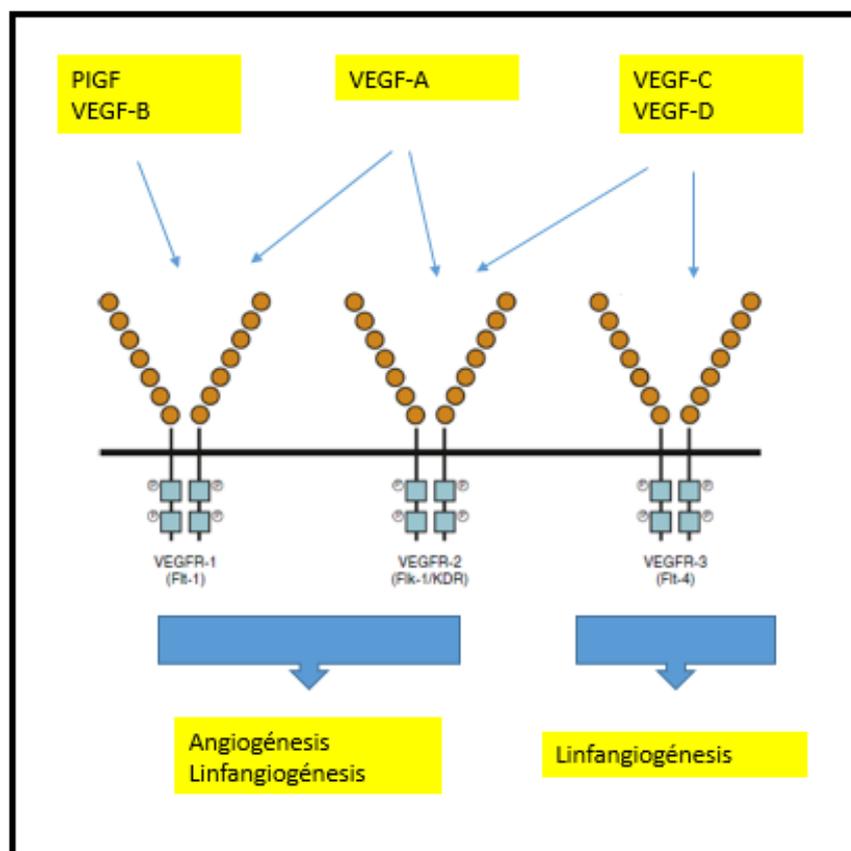


Figura 1. Representación de la familia de VEGF. Adaptado de Lankhorst y cols⁶⁷.

El más estudiado ha sido VEGF-A que se une a VEGFR-1 (por el que tiene una afinidad mayor) y VEGFR-2 (que media la mayoría de efectos biológicos siendo el principal receptor implicado en las señales proangiogénicas de VEGF)^{66,68}.

La unión de VEGF a VEGFR-2 estimula la actividad intrínseca de la tirosin quinasa de VEGFR-2, lo que pone en marcha varias cascadas de señalización. De forma más llamativa, la activación de VEGFR-2 recluta PI3-quinasa, que a su vez activa AKT que fosforila directamente a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) causando una mayor producción de óxido nítrico (NO). Éste, difunde de forma paracrina a las células musculares lisas vasculares adyacentes, activando la guanilato ciclasa con aumento de la producción de GMPc y vasodilatación⁶³.

El aumento de la expresión de VEGF es característico de algunos tumores y se ha vinculado a la expresión de otros factores de crecimiento como el factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, TNF α), el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*, EGF), la insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina (*Insuline-*

like Growth Factor, IGF-1) y los estrógenos. Además, se ha observado que la secreción de VEGF in vitro aumenta en caso de pérdida del gen supresor de tumores p53 o si existe amplificación de algunos oncogenes como HER2⁶⁹.

Puesto que la angiogénesis y el aumento de la densidad vascular en el tumor primario se correlacionan con un peor pronóstico y un aumento del índice de recaída, ya en 1971 Judah Folkman postuló que la inhibición de la angiogénesis tumoral podría detener el crecimiento tumoral en los seres humanos. Así, la antiangiogénesis se ha convertido en un tema clave de la investigación actual⁶¹.

Existen tres mecanismos principales para bloquear la señal de este sistema: bloqueando la unión de VEGF a su receptor (como es el caso de bevacizumab), bloqueando la señal a través de los receptores de VEGF (como por ejemplo ramucirunab que se une a VEGFR-2) o bloqueando la actividad quinasa de VEGFR-1, -2 y -3 mediante el uso de inhibidores tirosin quinasa (tales como sorafenib, sunitinib, pazopanib o axitinib)⁶².

Hasta la fecha se han aprobado diferentes fármacos antiangiogénicos en varios tumores sólidos (ver tabla 4). Bevacizumab es el primer antiangiogénico que fue aprobado por la FDA en 2004 tras demostrar ser eficaz en CCRm. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido predominantemente contra todas las isoformas de VEGF-A^{62-65,69}, que es la isoforma responsable de la angiogénesis patológica⁶⁹. Su eficacia, aparte de en CCRm y CMm, como ya se ha comentado, ha sido probada en diferentes tipos de cáncer metastásico mostrando beneficio en términos de SG y SLP en cáncer de pulmón no de células pequeñas no escamoso⁷⁰ y cáncer de cervix⁷¹; en SLP en cáncer de próstata⁷², cáncer de ovario⁷³, cáncer renal⁷⁴, glioblastoma⁷⁵ y cáncer gástrico⁷⁶; no habiendo observado beneficio en melanoma⁷⁷ ni cáncer de páncreas⁷⁸. Excepto en cáncer de ovario y en glioblastoma, donde bevacizumab ha mostrado actividad en monoterapia, los antiangiogénicos sólo han mostrado actividad significativa cuando se combinan con QT. Esto puede explicarse por el concepto de normalización vascular, partiendo de la base de que los vasos del tumor son vasos débiles y disfuncionales y dificultan la llegada de la QT. Estudios preclínicos han mostrado que la supresión de la señal de VEGF puede mejorar la función de los vasos del tumor (normalización vascular) y así la QT alcanzar el tumor más fácilmente. Sin embargo, la relevancia clínica de este fenómeno en los pacientes no está clara aún⁶².

Así, la FDA aprobó el uso de bevacizumab en primera línea y en combinación con QT en cáncer colorrectal, carcinoma de pulmón de células grandes no escamoso, cáncer de ovario y cérvix. En segunda línea ha sido aprobado en monoterapia en glioblastoma, con interferon alfa en carcinoma renal y con QT en CCRm. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) también ha aprobado bevacizumab en cáncer de mama en combinación con QT, pero no en glioblastoma ni en cáncer de cérvix.

A día de hoy, no se sabe por qué bevacizumab es eficaz en unos tumores primarios sí y en otros no (se cree que influyen las diferencias en la biología de estas neoplasias⁶²) y no se disponen de biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento con antiangiogénicos que identifiquen qué pacientes van a beneficiarse del mismo, evitando así efectos secundarios y costes innecesarios.

Fármaco antiangiogénico	Mecanismo de acción	Indicación clínica
Bevacizumab	Anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF-A	Cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de cérvix y glioblastoma
Aflibercept	Proteína de fusión dirigida contra VEGF-A, VEGF-B y PlGF	Cáncer colorrectal
Sorafenib	Inhibidor multiquinasa dirigido contra B/C-RAF, BRAF (V600E) KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3 y PDGFR-β	Carcinoma hepatocelular, carcinoma renal, carcinoma diferenciado de tiroides
Sunitinib	Inhibidor de múltiples receptores tirosina quinasa: PDGFRα y β, VEGFR1-3, KIT, FLT3, CSF-1R, RET	Carcinoma renal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumores neuroendocrinos pancreáticos
Axitinib	Inhibidor tirosin quinasa de VEGFR1-3	Cáncer renal
Nintedanib	Inhibidor multiquinasa dirigido a: VEGFR-1-3, PDGFR α y β, FGFR 1-3, Flt, Lck y Src	Cáncer de pulmón de células no pequeñas, Fibrosis pulmonar idiopática
Regorafenib	Inhibidor tirosin quinasa dirigido a: VEGFR 1-3, TIE2, KIT, RET, RAF-1, BRAF(V600E), PDGFR, FGFR, CSF1R	Cáncer colorrectal, GIST, carcinoma hepatocelular
Pazopanib	Inhibidor tirosin quinasa dirigido a: VEGFR 1-3, PDGFR α y β, c-KIT	Carcinoma renal, sarcoma de partes blandas
Cabozantinib	Inhibidor de múltiples receptores tirosin quinasa: MET, VEGF, AXL, RET, ROS1, TYRO3, MER, KIT, TRKB, FLT3 y TIE-2	Carcinoma medular de tiroides, carcinoma renal
Vandetanib	Inhibidor tirosin quinasa dirigido a: VEGFR 2-3, EGFR, RET	Carcinoma medular de tiroides
Lenvatinib	Inhibidor de los receptores tirosin quinasa: VEGFR1-3, FGFR1-4, PDGFRα, KIT y RET	Cáncer diferenciado de tiroides, cáncer renal
Ramucirumab	Anticuerpo humano dirigido a VEGFR-2	Cáncer colorrectal, cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica, cáncer de pulmón de células no pequeñas

Tabla 4. Fármacos antiangiogénicos aprobados. Datos recogidos de las fichas técnicas de cada uno de los fármacos.

2.4 Bevacizumab e hipertensión arterial (HTA)

El tratamiento con bevacizumab se asocia con diferentes efectos adversos como perforación gastrointestinal, fístula, complicaciones postquirúrgicas (retraso en la cicatrización de heridas, dehiscencia, equimosis, sangrado de la zona quirúrgica), hemorragia, eventos tromboembólicos venosos y arteriales, proteinuria o HTA, siendo las dos últimas las complicaciones más frecuentes^{69,79}. En concreto, la HTA, se ha constatado en un 20-27% de los pacientes tratados con bevacizumab, siendo de grado 3-4 en el 6-10% de los casos, habiendo observado un riesgo relativo de desarrollar HTA grado 3-4 en los pacientes que reciben bevacizumab de 5.28⁸⁰.

En función de la severidad de la HTA, según la última versión publicada por el Instituto Nacional del cáncer sobre los Criterios Terminológicos Comunes para Eventos Adversos (CTCAE, también denominados "criterios comunes de toxicidad"), se diferencian 4 grados tal y como se muestra a continuación:

	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
HTA	PAS \geq 120-139 mmHg o PAD \geq 80-89 mmHg	PAS \geq 140-159 mmHg o PAD \geq 90-99 mmHg); indicada intervención médica; recurrente o persistente (\geq 24 horas); aumento sintomático por $>$ 20 mmHg (diastólica) o para $>$ 140/90 mmHg si previamente normotenso; indicada monoterapia	PAS \geq 160 mmHg o PAD \geq 100 mmHg; indicada intervención médica: más de un medicamento o aumentar tratamiento previo.	Con consecuencias que amenazan la vida (por ejemplo HTA maligna, transitoria o déficit neurológico permanente, crisis hipertensiva); indicada intervención urgente.	Muerte

Tabla 5. Grados de hipertensión arterial (HTA). Adaptado de CTCAE 4.03 versión 14 de junio de 2010
HTA: hipertensión arterial; PAS: Presión Arterial Sistólica. PAD: Presión Arterial Diastólica

Parece que los pacientes con antecedente de HTA están más predispuestos a desarrollar HTA durante el tratamiento con un anti-VEGF⁶⁵. Aunque su fisiopatología no se conoce con exactitud, se han propuesto varios mecanismos:

-Inhibición de la vía de señalización de NO: como ya se ha comentado, VEGF al unirse a VEGFR-2 estimula la actividad intrínseca de tirosina quinasa que activa en última instancia a la eNOS que aumenta la producción de NO por parte de las células endoteliales por lo que la disminución de los niveles de VEGF puede suprimir la señal de NO, lo que

ocasionaría vasoconstricción sistémica y aumento de la presión sanguínea. In vitro, bevacizumab ha demostrado disminuir los niveles de NO⁸¹. En estudios preclínicos in vivo, como el publicado por el grupo de Facemire, se observó que la administración de un anticuerpo anti-VEGFR-2 en ratones produjo un aumento de la tensión arterial (TA) de ≈ 10 mmHg y una disminución de la expresión de las sintasa endotelial y neuronal de óxido nítrico en el riñón (eNOS y nNOS). Al ser tratados con un inhibidor de la producción de NO ya no hubo diferencias en las cifras de TA entre los ratones tratados con un anti-VEGFR-2 y los no tratados, lo que sugiere que VEGF, actuando a través de VEGFR-2, desempeña un papel crítico en el control de la TA mediante la expresión NOS⁸².

El NO producido por la eNOs controla la TA a través de diferentes mecanismos: inhibición de la agregación de plaquetas y leucocitos, inhibición de la proliferación de las células musculares lisas del endotelio y reducción de la resistencia vascular, vasodilatación por difusión a través del endotelio al músculo liso vecino y aumento de la excreción urinaria de sodio⁸³.

La prostaciclina (PGI₂), que es un vasodilatador, también podría participar en la HTA inducida por la inhibición de la angiogénesis dado que VEGF activa la producción de PGI₂ en células endoteliales tras la heterodimerización de VEGFR-1 y -2⁸⁴.

-Vías vasoconstrictoras: hay datos que sugieren que un aumento del vasoconstrictor endotelina 1 (ET-1) también participa en la patogénesis de la HTA inducida por antiangiogénicos. Kappers y su grupo observaron elevaciones de los niveles circulantes de ET-1 de forma paralela a los aumentos de las cifras de TA tras tratamiento con sunitinib (en ratones y seres humanos)⁸⁵. Se ha postulado que el aumento de ET-1 tras la inhibición de VEGF podría explicarse parcialmente por una disminución de la biodisponibilidad de NO (teniendo en cuenta que el NO disminuye la síntesis de ET-1), pero los resultados son contradictorios⁶⁷. En varios modelos preclínicos, la coadministración de un antagonista del receptor de endotelina evita en gran medida el aumento de la TA inducido por la terapia antiangiogénica⁸⁶.

-Rarefacción capilar: consiste en una disminución del número de arterias pequeñas y arteriolas en respuesta al tratamiento con inhibidor de VEGF⁶⁵. Partiendo de la base de

que la señal de VEGF es necesaria para la supervivencia de las células endoteliales en condiciones fisiológicas, es esperable que la inhibición de la vía VEGF provoque apoptosis y rarefacción vascular en tejidos no tumorales con posterior hipertensión. La primera evidencia de rarefacción con un anti-VEGF en humanos se publicó en 2008 por Steeghs y colaboradores. Llevaron a cabo un estudio fase I en el que administraron telatinib [un inhibidor tirosin quinasa de VEGFR-2 y -3, PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas) y c-KIT] a pacientes con tumores sólidos y vieron una disminución en el número de capilares con aumento de la presión sanguínea sistólica y diastólica⁸⁷. A pesar de que no está claro si la rarefacción es estructural (desaparición de capilares), funcional (no perfusión de capilares) o una combinación de ambos, se cree que este fenómeno contribuye a la HTA que se desarrolla con los inhibidores de VEGF⁶⁵. Sin embargo, Belcik y su equipo no vieron disminución en el flujo sanguíneo microvascular ni en el volumen sanguíneo en el músculo esquelético, miocardio o riñón en ratones tratados con anti-VEGF a pesar de haber evidenciado aumento de las cifras de TA⁸⁸, por lo que otros autores cuestionan que este fenómeno participe en la fisiopatología de la HTA.

-Familia de tirosin quinasa Src: es otra vía que participa en la cascada de señales de VEGF y que ha mostrado interactuar con receptores tirosin quinasa transmembrana de diferentes factores de crecimiento [PDGF, EGF, bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*, factor de crecimiento básico de fibroblastos) y CSF-1 (*Colony Stimulating Factor 1*, estimulador de colonias)]. Su participación fue demostrada en 1999 por el grupo de He, al observar que la unión de VEGF a flk-1/KDR (actualmente conocido como VEGFR-2) activaba c-Src y con ello la producción de prostaciclina en células endoteliales de la aorta bovina⁸⁹.

-El aumento de la rigidez de las arterias (ya sea en vasos proximales o distales) también se ha asociado al desarrollo de hipertensión. Veronese y colaboradores observaron aumento de la TA así como aumento de la rigidez vascular (medida con el índice de aumento de presión arterial aórtica y la velocidad de onda de pulso aórtica) en 20 pacientes tratados con sorafenib⁹⁰.

-Alteración en la relación presión-natriuresis: la capacidad del riñón de excretar sodio en respuesta a un aumento crónico de la TA es un mecanismo de respuesta a la HTA. Hay

dos posibles mecanismos que sugieren que la inhibición de VEGF puede cambiar la curva de presión-natriuresis. Por un lado, el NO actúa directamente en la regulación de presión-natriuresis y feedback tubuloglomerular. El cese de la función de la eNOS a través de la inhibición de VEGF puede provocar la retención de sodio y el aumento del volumen extracelular, perpetuando la hipertensión⁶³. Esto se apoya en estudios con modelos animales como el que ya se ha comentado de Facemire, donde la inhibición de VEGFR-2 disminuye la expresión y la actividad de la NO sintasa, lo que provoca desplazamiento a la derecha en la relación de presión arterial-natriuresis⁸². Por otro lado, se ha observado en modelos animales con ratas que, en respuesta a una dieta rica en sal, aumenta la producción de VEGF-C por parte de los macrófagos, uniéndose a VEGFR-3 lo cual estimula la linfangiogénesis y la expresión de la eNOS, amortiguando la sobrecarga de volumen generada por el exceso de sal (se cree que este entramado linfático forma un compartimento que hace de tampón del volumen extracelular)⁹¹. El bloqueo de este mecanismo podría contribuir por tanto al aumento de TA sólo en los inhibidores tirosin quinasa dirigidos al VEGFR-3.

-Alteraciones del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA): Aunque cabe esperar que la disfunción endotelial provoque isquemia glomerular que conlleve a una estimulación del SRAA, lo cierto es que no existe evidencia experimental que lo soporte⁶³. Dos estudios clínicos en pacientes tratados con sorafenib⁹⁰ o sunitinib⁸⁵ no observaron cambios en las concentraciones de aldosterona a pesar del aumento de TA.

-El estrés oxidativo podría estar involucrado en la patogénesis de la HTA inducida por el bloqueo de la señal de VEGF. En este sentido, se ha demostrado in vitro que la exposición de las células endoteliales a peróxido de hidrogeno (H₂O₂) aumenta los niveles de VEGF y VEGFR-2⁹².

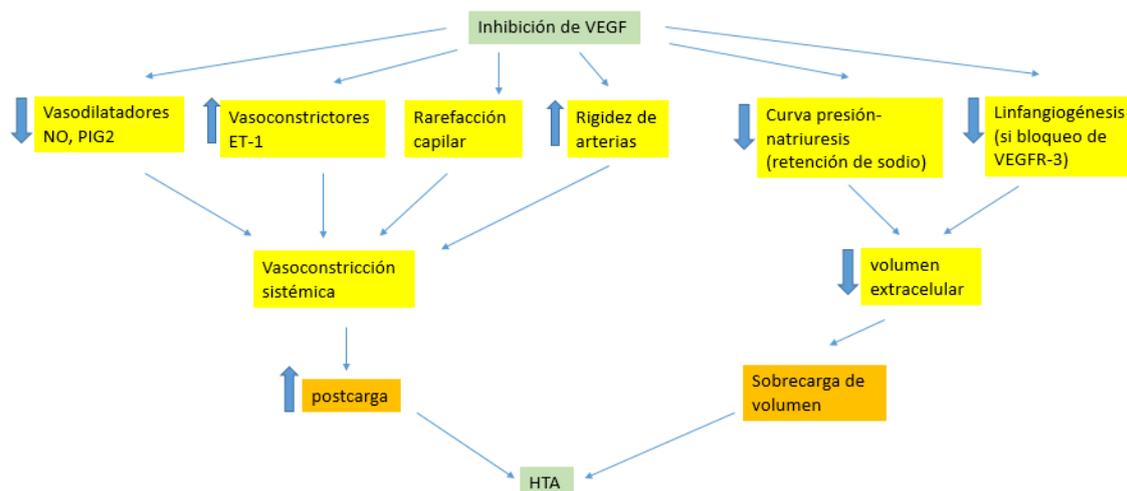


Figura 2. Mecanismos de HTA inducida por la inhibición de la vía VEGF posiblemente implicados. Adaptado de Robinson y cols⁶³.

Aunque en la práctica clínica no hay un algoritmo para el manejo de la HTA inducida por bevacizumab, se recomienda monitorización de la TA durante el tratamiento y suspender éste de forma permanente si la HTA es clínicamente significativa y no se puede controlar adecuadamente con el tratamiento antihipertensivo, o si el paciente desarrolla crisis hipertensivas o encefalopatía hipertensiva⁷⁹. Los pacientes deben tener la TA controlada antes de comenzar con el antiangiogénico, porque cabe esperar una exacerbación de la HTA ya existente al inicio del mismo. Es aconsejable tomar una serie de medidas dietéticas como disminuir la ingesta de alcohol o de la sal en la dieta. Como regla general, el tratamiento antiHTA debería instaurarse cuando la cifra de TA $\geq 140/90$ mmHg, pero en grupos de riesgo (pacientes diabéticos o con insuficiencia renal crónica) ha de hacerse con cifras $\geq 130/80$ mmHg. La elección del fármaco debe individualizarse, teniendo en cuenta que los inhibidores del SRA o antagonistas del calcio son buenas opciones como primera aproximación^{63,86}. Sin embargo, dado que la etiología de la HTA es multifactorial puede que sean necesarios combinar varios fármacos para su tratamiento.

2.5 HTA como factor pronóstico y predictivo de respuesta a bevacizumab

Varios trabajos han observado una asociación entre el desarrollo de HTA durante el tratamiento con bevacizumab y la respuesta tumoral sugiriendo que la HTA podría comportarse como un factor predictivo de respuesta, siendo necesarios estudios prospectivos de confirmación. Centrándonos en los pacientes con cáncer colorrectal y de mama:

Cáncer colorrectal

Son varios los análisis retrospectivos que se han realizado en este sentido en CCRm:

El grupo de Scartozzi observó en 39 pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con FOLFIRI-bevacizumab que la mediana de SLP fue superior en pacientes que desarrollaron HTA grado 2-3 (20% de los casos) frente a los que no (14.5 vs 3.1 meses; $p=0.04$). Además, vieron un 75% de respuestas parciales en el grupo de HTA frente al 32% del grupo sin HTA ($p=0.04$)⁹³.

Posteriormente, se publicó otro trabajo por Wu y cols., donde la existencia de cualquier grado de HTA se relacionó con un aumento de SG y SLP en 84 pacientes con cáncer colorrectal, alcanzando la significación estadística en aquéllos con enfermedad metastásica ($p=0.03$ y $p=0.01$ para SG y SLP respectivamente)⁹⁴.

Burnette y cols, llevaron a cabo otro estudio en 36 pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con FOLFOX-bevacizumab sugiriendo que aquéllos que presentaron HTA (33% de los casos) tuvieron mejores resultados en términos de beneficio clínico (considerando respuestas y estabilizaciones de la enfermedad, se observó un beneficio del 100% vs 58% en el grupo sin HTA) y SG (mediana de 31.8 vs 17.7 meses)⁹⁵.

Osterlund y cols., contaron con un tamaño muestral mayor (101 pacientes) e incluyeron a pacientes en tratamiento con QT y bevacizumab en cualquier línea de tratamiento. Al igual que estudios previos, los pacientes con HTA grado ≥ 1 (el 56% de la muestra) mostraron un aumento de TRG (30 vs 20% $p=0.025$), de SLP (mediana de 10.5 vs 5.3

meses, $p=0.008$) y de SG (25.8 vs 11.7 meses, $p=0.001$). Además, el desarrollo de HTA en los 3 primeros meses fue factor pronóstico independiente en el análisis multivariante ($p=0.007$) junto con la línea de tratamiento y el número de órganos afectados por la enfermedad oncológica⁹⁶.

En la misma línea, el grupo italiano de De Stefano observó en 74 pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con QT y bevacizumab una correlación entre el hallazgo de HTA grado $\geq 2-4$ (presente en el 17.6% de los pacientes) y aumento de la tasa de respuestas objetivas (considerando la suma de respuestas completas y respuestas parciales) (84.6% vs 42.6% $p=0.006$) y de la mediana de SLP (15.1 meses vs 8.3 meses $p=0.04$) sin mejora en SG estadísticamente significativa⁹⁷.

De forma similar, Tahover y cols. constataron en 181 pacientes con CCRm, que aquéllos con HTA grado 2-3 durante el tratamiento antiangiogénico (en primera o segunda línea), lo cual aparecía en el 44.75% de los casos, tuvieron medianas de SG y SLP superiores (mediana de SG no alcanzada vs 36.8 meses $p=0.029$; mediana de SLP 29.9 vs 17.2 meses $p=0.024$)⁹⁸.

Khoja y cols., también publicaron un artículo donde, en pacientes con CCRm en tratamiento con combinación de QT y agente biológico (bevacizumab/inhibidor tirosina quinasa), encontraron variación en la TR en función de la HTA (86% en los pacientes que presentaron HTA \geq grado 2 vs 42% en HTA grado 1 o no HTA $p=0.043$), así como una mejora de la mediana de SG pero sin alcanzar la significación estadística (25.2 vs 21.6 meses $p=0.270$), lo cual, sugieren los autores, puede deberse al tamaño muestral puesto que sólo 7 de los 50 pacientes incluidos desarrollaron HTA grado ≥ 2 ⁹⁹.

Además, se ha llevado a cabo un metaanálisis publicado en 2013 por Cai y cols., encontrando que la HTA inducida por bevacizumab en pacientes con CCRm se asoció con un aumento de la SLP (HR=0.57, IC 95% 0.46-0.72 $p<0.001$), de la SG (HR=0.50, IC 95% 0.37-0.68 $p<0.001$) y de la TRG (RR=1.57, IC 95% 1.07-2.30 $p<0.05$) en comparación con los pacientes sin HTA, por lo que los autores concluyen que la HTA favorecida por el bloqueo angiogénico podría representar un factor pronóstico en pacientes con CCRm¹⁰⁰.

Hay datos disponibles también en pacientes de edad avanzada (≥ 70 años), publicados en 2015 por Feliu y cols., que muestran correlación entre el desarrollo de HTA y SG tras analizar a 127 pacientes retrospectivamente con una mediana de SG no alcanzada vs 16.9 meses (en el grupo con HTA vs no HTA respectivamente; $p=0.012$)¹⁰¹.

Más recientemente, se ha publicado otro estudio por el grupo de Dionisio de Sousa en la misma dirección, apareciendo la HTA grado 2-3 como posible predictor de respuesta al tratamiento con bevacizumab y de SLP ($p<0.001$)¹⁰².

Aparte, se ha estudiado si una disminución temporal de la TA tras la administración de bevacizumab tiene relevancia clínica. Así, el grupo japonés de Kanai observó que los pacientes que tuvieron una bajada temporal de 25-30 mmHg a los 90 y 180 min tras iniciar la administración presentaron un tiempo al fallo de tratamiento (TFT) más largo en comparación con los que mostraron una variación de TA menor de forma estadísticamente significativa, por lo que sugieren que esta reducción de presión temporal podría considerarse un factor predictivo de respuesta a bevacizumab¹⁰³.

Sin embargo, también disponemos de estudios negativos al respecto. En este sentido, el estudio fase II BOXER (que evaluó XELOX-bevacizumab como tratamiento perioperatorio en pacientes con cáncer colorrectal con metástasis hepáticas exclusivamente no candidatos a cirugía de inicio) no encontró asociación entre el desarrollo de HTA inducida por bevacizumab y la TR radiológicas ($p=0.642$), la SLP ($p=0.664$) ni la SG ($p=0.480$)¹⁰⁴.

Cáncer de mama

Un análisis retrospectivo del estudio E2100 ya comentado, que comparó paclitaxel vs bevacizumab con paclitaxel en primera línea de CMm, evidenció relación entre el desarrollo de HTA grado 3-4 (14.8% de casos) con bevacizumab y el beneficio clínico en términos de SG (38.7 vs 25.3 meses, $p=0.002$)¹⁰⁵.

En la misma dirección, Gampenrieder y cols. exploraron el efecto de la aparición de HTA con bevacizumab en las pacientes con CMm tratadas en su centro. De las 147 pacientes en las que se pudo evaluar la respuesta y la TA, el 38% presentaron HTA durante el

tratamiento, observando mejores resultados en este subgrupo (SLP 13.7 vs 6.6 meses HR=0.34, $p<0.001$; SG no alcanzada vs 18.4 meses HR=0.20, $p<0.001$). En el análisis multivariante, la HTA resultó ser un factor predictivo independiente de SLP (HR=0.42, $p<0.001$) y de SG (HR=0.24, $p=0.001$)¹⁰⁶.

En otros tipos de tumores primarios, también se ha visto un efecto favorable del desarrollo de HTA tras tratamiento antiangiogénico, como es el caso de pacientes con recaída de glioblastoma multiforme¹⁰⁷, cáncer renal¹⁰⁸ y cáncer de pulmón no microcítico metastásico¹⁰⁹.

Sin embargo, el análisis final del estudio ATHENA, donde se evaluaron 2264 pacientes con CMm o recaída local que recibieron tratamiento prolongado con bevacizumab junto con QT en primera línea en la práctica clínica, no se encontró relación entre la aparición de HTA y SG¹¹⁰.

Del mismo modo, el equipo de Hurwitz analizó los resultados de siete ensayos clínicos fase III de bevacizumab comparado con placebo obteniendo datos de un total de 6486 pacientes con CCRm, CMm, cáncer de pulmón no microcítico metastásico, cáncer de páncreas y cáncer renal metastásico. Los resultados fueron negativos en 6 de los trabajos incluidos, mostrando que la HTA inducida por antiangiogénicos de forma precoz (en los primeros 60 días del tratamiento) no podía considerarse un factor pronóstico ni predictivo en términos de SLP ni de SG. En el caso del CMm se incluyeron los estudios ya comentados RIBBON-1 (combinación de bevacizumab con capecitabina o taxano/antraciclinas en primera línea) y AVADO (dos dosis diferentes de bevacizumab con docetaxel en primera línea). Sólomente en el estudio AVF2107g (estudio pivotal de bevacizumab en CCRm) se vio que la HTA predijo un aumento de supervivencia ($p<0.0001$)¹¹¹.

Por lo tanto, ante la discordancia de los datos hasta la fecha, son necesarios ensayos clínicos prospectivos que validen la HTA como un biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento antiangiogénico.

2.6 VEGF circulante como factor pronóstico y predictivo de respuesta a bevacizumab

Varios estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que VEGF-A es la molécula clave en la promoción de la angiogénesis y que participa activamente en el crecimiento tumoral y en el desarrollo de metástasis¹¹². En la búsqueda de biomarcadores, la determinación de la concentración de proteínas circulantes en sangre se ha convertido en una estrategia atractiva, en parte, por ser fácilmente accesible, aunque, a día de hoy, no se ha validado para su uso en práctica clínica. En concreto, sobre los niveles plasmáticos de VEGF hay datos contradictorios. Se ha visto que VEGF y sus receptores están sobreexpresados con frecuencia en tumores sólidos, incluyendo el cáncer de mama, pulmón de células no pequeñas, colorrectal y próstata¹¹³.

Centrándonos en pacientes con CCRm, Bestas y cols., tras analizar a 70 pacientes, observaron que niveles de VEGF elevados en suero se correlacionaron con un estadio más avanzado de la enfermedad así como con la presencia de metástasis¹¹⁴. En la misma línea, Divella y cols., en una cohorte de 103 pacientes, vieron que niveles circulantes elevados de VEGF se asociaron con la existencia de metástasis hepáticas ($p=0.004$), así como con un pronóstico peor en este subgrupo¹¹⁵. Por su parte, Kwon y cols., examinaron la expresión de niveles de VEGF en suero de pacientes con CCR ($n=132$) que iban a someterse a cirugía curativa, encontrando, aparte de que los niveles de VEGF eran superiores en los pacientes con cáncer en comparación con el grupo control [$n=50$, $p<0.001$], que valores altos de VEGF preoperatorio se relacionaron con el tamaño del tumor ($p=0.012$) y con una SG menor ($p=0.053$), siendo propuesto tras el análisis multivariante como un factor de mal pronóstico para SG¹¹⁶.

Un análisis retrospectivo de dos estudios fase III randomizados; el HORIZON II (que evaluó la eficacia de un inhibidor tirosina quinasa de VEGFR (cediranib) con QT estándar frente a placebo con QT en primera línea) y el HORIZON III (que comparó cediranib con QT estándar frente a bevacizumab con QT en primera línea), exploró el valor de los niveles basales de VEGF como biomarcador pronóstico y predictivo de respuesta. Con más del 85% de disponibilidad de los datos de cada estudio, observaron que niveles basales de VEGF elevados se asociaron con peores resultados en SLP en ambos estudios

y con peor SG en el HORIZON II, sin poder considerarse factor predictivo de respuesta a cediranib¹¹⁷.

Se obtuvieron resultados similares en un análisis combinado de cuatro estudios fase III con bevacizumab en pacientes con cáncer colorrectal, pulmonar y renal metastásico (AVF2107g, ECOG 4599, AVAIL y AVOREN). Con un total de 1816 pacientes incluidos, cifras basales de VEGF circulante elevadas se vincularon con una SLP y SG menor, pero tampoco pudo considerarse un factor predictivo de respuesta al antiangiogénico¹¹⁸.

En el congreso de ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) 2017, Tabernero y cols., comunicaron un análisis retrospectivo del estudio VELOUR (estudio fase III que demostró que la adición de otro antiangiogénico, aflibercept, a FOLFIRI mejoró la supervivencia y las TR en pacientes con CCRm que habían fracasado a tratamiento previo basado en oxaliplatino, incluidos los pacientes tratados previamente con bevacizumab) con el objetivo de correlacionar la respuesta clínica del grupo pretratado con bevacizumab y distintos biomarcadores potenciales relacionados con la angiogénesis (determinados en plasma en el momento basal). Observaron una asociación entre el aumento de la concentración de VEGF-A y la progresión de la enfermedad, sugiriendo que el tratamiento con bevacizumab podría modular la expresión de biomarcadores asociados con la resistencia adquirida al tratamiento con bevacizumab (VEGF-A), aunque en esos casos seguía siendo activo aflibercept¹¹⁹.

Considerando no sólo los niveles basales, Keskin y cols. monitorizaron los niveles de VEGF séricos antes y después del tratamiento con QT-bevacizumab en 33 pacientes con CCRm, observando concentraciones de VEGF en suero superiores en los pacientes con CCRm en comparación con los controles sanos ($p < 0.001$). Se vio correlación entre los niveles de VEGF y la aparición de respuesta parcial de la enfermedad al tratamiento ($r = 0.82$; $p < 0.01$). Además, los pacientes con cáncer de recto con valores menores de VEGF (< 147.79 pg/mL) antes del tratamiento tuvieron una SG mayor (27.93 frente a 23.27 meses, $p = 0.026$). En el análisis multivariante los niveles de VEGF fueron considerados factor pronóstico¹²⁰. Recientemente, Marisi y cols., han publicado un análisis retrospectivo con un total de 129 pacientes procedentes del estudio fase III ITACa (donde se incluyeron pacientes con CCRm tratados con QT con o sin bevacizumab) en el

que han analizado los niveles de ARNm de VEGF circulante al inicio del estudio, en la primera evaluación clínica y en la progresión, observando que los pacientes tratados con bevacizumab con una reducción mayor o igual al 30% en los niveles de VEGF desde el inicio hasta la primera evaluación clínica mostraron una SG mayor en comparación con los que no presentaron esta disminución de VEGF ($p=0.008$), sin encontrar diferencias en aquéllos tratados sólo con QT, concluyendo que una disminución en la expresión de VEGF desde el inicio hasta la primera evaluación clínica podría ser predictivo de respuesta a bevacizumab¹²¹.

En cuanto al cáncer de mama, se han detectado niveles de VEGF en suero más altos en pacientes con tumores metastásicos que en pacientes con estadio precoz¹²². Además, niveles más altos de VEGF se han relacionado con mal pronóstico, disminución de SG y resistencia a la terapia hormonal¹¹³, aunque Hodorowicz-Zaniewska y cols. no encontraron relación entre los niveles basales de VEGF en suero y factores pronósticos clínico-patológicos (tamaño tumoral, afectación ganglionar, estadio, tipo histológico, grado, multifocalidad, estado de los RE y RProg y sobreexpresión de HER2) en 87 pacientes con cáncer de mama no metastásico¹²³.

En relación con el papel de VEGF como factor predictivo, disponemos también de estudios en cáncer de mama, como el de Burstein y cols., que en 49 mujeres con CMm en tratamiento con vinorelbina y bevacizumab, vieron que niveles basales bajos de VEGF en plasma se asociaron con un tiempo a la progresión más largo ($p=0.012$)¹²⁴.

Lissoni y cols., quisieron estudiar el efecto de la QT en la secreción de VEGF en 14 pacientes con CMm y ver la relación con la respuesta al tratamiento, observando que los niveles de VEGF en suero disminuyeron significativamente en las pacientes con respuesta parcial o enfermedad estable, mientras que no se constató esta disminución en aquéllas que progresaron¹²⁵.

De forma similar, Tang y cols. determinaron en 61 pacientes con CMm los niveles séricos de VEGF al inicio del tratamiento con QT (B0), tras un ciclo (B1), tras 3 ciclos (B3) y tras 5-6 ciclos (B5-6) y lo correlacionaron con la respuesta al tratamiento y con la supervivencia. No encontraron asociación entre la respuesta a la QT y los niveles basales de VEGF o tras un ciclo, pero sí entre los niveles de VEGF tras recibir 3 y 5-6 ciclos de

tratamiento ($p=0.012$ y $p<0.001$ respectivamente), de tal manera que las pacientes que obtuvieron control de la enfermedad presentaron una disminución de los valores de VEGF, mientras que aquéllas que progresaron una elevación de los mismos, sugiriendo que la determinación seriada de VEGF en suero podría ser útil para evaluar la eficacia del tratamiento y el pronóstico. El modelo de riesgo proporcional de Cox reveló que la normalización del valor de VEGF tras tratamiento y el aumento de VEGF tras 5-6 ciclos fueron predictores de supervivencia independientes ($p=0.031$ y $p=0.045$ respectivamente)¹²⁶.

Sin embargo, también disponemos de estudios negativos. En este sentido, Kopetz y cols., en un estudio fase II con pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con FOLFIRI-bevacizumab, no hallaron relación entre los niveles basales en plasma de VEGF y SLP o SG en los 40 pacientes estudiados¹²⁷.

Al igual en cáncer de mama, Colleoni y cols., observaron en 63 pacientes con CMm pretratado en tratamiento con dosis metronómicas de ciclofosfamida y metotrexato, que tanto las pacientes con tumores que respondían al tratamiento como aquéllas en las que había progresión de la enfermedad presentaron una disminución similar de los niveles de VEGF en suero tras el tratamiento ($p=0.078$)¹²⁸.

Im y cols., en un fase II con pacientes con CMm en tratamiento de primera línea con docetaxel y epirrubicina en el que determinaron prospectivamente los niveles de VEGF circulantes en 38 pacientes, tampoco encontraron relación entre éstos y la TR o la supervivencia¹²⁹.

El efecto de bevacizumab sobre los niveles de VEGF en plasma no está claro. Por un lado, Willet y su equipo, dentro de un estudio fase II que estudió el papel de bevacizumab junto con quimiorradioterapia preoperatoria en cáncer de recto localmente avanzado, vieron que bevacizumab aumentó los niveles en plasma de VEGF en 31 pacientes incluidos¹³⁰. Yang y cols., en un fase II que demostró que bevacizumab podía mejorar el tiempo a la progresión en comparación con placebo en cáncer renal metastásico, midieron la concentración de VEGF en 113 pacientes, aunque 76 de ellos presentaron un valor menor al límite inferior de detección (40 pg/mL). No se observó asociación entre el valor de VEGF y la respuesta a bevacizumab o el tiempo a la progresión aunque los autores

destacaron la sensibilidad limitada del estudio. Además, constataron un aumento progresivo de los niveles basales de VEGF tras tratamiento antiangiogénico¹³¹. Pero, la medición en plasma de VEGF no discriminaba entre VEGF libre y el VEGF unido a bevacizumab. Por ello, Loupakis y cols. en 2007 analizaron la viabilidad de la inmunodeplección de muestras de plasma en 5 pacientes, eliminando todas las inmunoglobulinas, separando así el VEGF unido a bevacizumab del VEGF libre, para valorar los cambios de VEGF libre tras tratamiento con bevacizumab en pacientes con cáncer metastásico. Vieron que los niveles de VEGF libre medidos después de la inmunodeplección de las muestras de plasma disminuyeron significativamente desde el día 0 (pretratamiento) al día 14 del tratamiento con bevacizumab, sugiriendo que el anticuerpo anti-VEGF reduce los niveles plasmáticos del factor de crecimiento biológicamente activo ($p < 0.02$). Los niveles de VEGF de las muestras de plasma sin depurar también disminuyeron tras el tratamiento con bevacizumab, aunque no de forma significativa, lo que pone de manifiesto la necesidad de la inmunodeplección para detectar variaciones significativas entre muestras antes y después del tratamiento. No hubo diferencias significativas entre los niveles de VEGF de las muestras deplecionadas y no deplecionadas antes del tratamiento con bevacizumab, pero sí se detectaron tras el tratamiento antiangiogénico ($p = 0.02$), lo que sugiere que el procedimiento de inmunodeplección no impactó sobre el VEGF plasmático libre basal, demostrando la validez de la medición de los valores biológicos factor de crecimiento activo¹³². Brostjan y cols. publicaron resultados parecidos en pacientes con cáncer de recto tratados con bevacizumab neoadyuvante, confirmando un aumento del VEGF total tras el tratamiento (al analizar el plasma disponible de 6 pacientes), pero biológicamente inactivo en su mayoría por estar unido a bevacizumab, es decir se veía una disminución de los niveles de VEGF libre en plasma¹³³. También Gordon y cols. mostraron en un estudio fase I de 25 pacientes con cáncer (principalmente sarcoma, renal y mama) tratados con dosis cada vez mayores de un anticuerpo anti-VEGF, una reducción del VEGF sérico libre cuando se comparaba con concentraciones séricas basales¹³⁴.

En la misma dirección, otro trabajo del grupo de Loupakis en 2011, realizado en una cohorte de 25 pacientes del estudio fase II con triplete de QT (FOLFOXIRI) y bevacizumab en primera línea de CCRm, evidenció una disminución prolongada de los niveles plasmáticos de VEGF libre tras 15 días de tratamiento ($p = 0.016$), 57 días ($p = 0.002$) y 155 días ($p = 0.001$) en comparación con los niveles basales, continuando

bajos también en el momento de la progresión radiológica de la enfermedad ($p < 0.0001$)¹³⁵.

Un análisis del estudio japonés fase II AVASIRI, que investigó FOLFIRI-bevacizumab en segunda línea en 25 pacientes con CCRm, observó que la concentración de VEGF-A en suero (medida de forma basal y al 1, 2, 4 y 6 meses tras el inicio de tratamiento) disminuyó tras el inicio del tratamiento ($p < 0.0001$). Varios pacientes mostraron un aumento del nivel sérico de VEGF-A en el momento de la progresión. Cabe destacar que cuatro pacientes de los nueve no respondedores mostraron un aumento precoz de la concentración sérica de VEGF-A. La SLP de estos cuatro pacientes fue significativamente menor que la de los otros 21 pacientes (200 frente a 373 días, respectivamente, $p = 0.009$), sugiriendo que una elevación precoz del nivel sérico de VEGF-A posterior a una disminución inicial es predictivo de resistencia precoz a bevacizumab¹³⁶.

Azzaritti y cols., también evaluaron de forma prospectiva el papel de los niveles de bevacizumab, VEGF total y VEGF no unido a bevacizumab en plasma de 20 pacientes con CCRm en tratamiento con QT-bevacizumab. Las mediciones se realizaron en 3 momentos: basal, antes del 2º y antes del 5º ciclo. Constataron que la concentración de bevacizumab aumentó con el tiempo en los pacientes con respuesta parcial en comparación con aquéllos con enfermedad estable o progresión de la enfermedad, sugiriendo que podría explicarse por el metabolismo de bevacizumab influido en parte por polimorfismos de VEGF que pueden ocasionar resistencia al antiangiogénico (lo cual se abordará en el siguiente capítulo). Los niveles basales de VEGF total no se correlacionaron con la respuesta al tratamiento. La ratio de VEGF no unido a bevacizumab / VEGF total disminuyó significativamente antes del 5º ciclo en pacientes con respuesta parcial y enfermedad estable ($p < 0.05$) y aumentó en aquéllos con progresión de la enfermedad ($p < 0.05$)¹³⁷.

No obstante, para poder sacar conclusiones, todas estas observaciones deberían analizarse en ensayos clínicos con mayor número de pacientes y de forma prospectiva. En este sentido, en CCRm, un fase III que comparó XELIRI-bevacizumab vs FOLFIRI-bevacizumab en primera línea en 285 pacientes, incluyó la determinación de VEGF-A en plasma de forma basal y durante el tratamiento, observando que los niveles disminuyeron

significativamente durante el tratamiento ($p < 0.001$) sin verse correlación con la respuesta. El nivel basal de VEGF-A tampoco fue predictor de respuesta¹³⁸.

Recientemente en cáncer de mama, el ensayo MERIDIAN, un fase III de pacientes con CMm HER2 negativo en primera línea con paclitaxel-bevacizumab vs paclitaxel-placebo, se diseñó para investigar prospectivamente la determinación de VEGF-A basal en plasma como biomarcador predictivo de respuesta a bevacizumab en términos de SLP. Se vio mejora significativa en SLP con la adición de bevacizumab a paclitaxel de forma consistente con estudios previos publicados, tanto en la población por intención de tratar como en el subgrupo con altos niveles de VEGF en plasma, pero al analizar la SLP en función de los niveles de VEGF-A en 481 pacientes, no se observó un efecto predictivo del mismo ($p = 0.46$)¹³⁹.

Se han analizado otros factores angiogénicos/citoquinas en plasma, como se refleja por ejemplo en el trabajo previamente mencionado de Kopetz¹²⁷, en el que se observó un aumento de los niveles de varios de ellos antes de la progresión radiológica, alcanzando la significación estadística en el caso del factor de crecimiento básico de fibroblatos (*basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF), factor de crecimiento hepático (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF), factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor*, PlGF), factor derivado del estroma (*Stromal-Derived Factor-1*, SDF-1), y proteína quimiotáctica de monocitos 3 (*Monocyte Chemotactic Protein-3*, MCP-3); todo lo cual podría contribuir a identificar marcadores moleculares que nos ayuden a elegir los tratamientos sucesivos de forma personalizada.

2.7 Polimorfismos de VEGF y sus receptores en línea germinal y respuesta a bevacizumab

Los polimorfismos genéticos hacen referencia a una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población. Los tipos más frecuentes son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que afectan a un sólo par de bases (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) con una frecuencia de al menos el 1% en la población, indels (polimorfismos de inserción / deleción) o cambios estructurales mayores como variantes de número de copias. Polimorfismos en la región promotora o en los exones pueden afectar a la expresión génica o a las funciones de las

proteínas, influyendo en diferentes características entre los individuos. En general, el polimorfismo genético se refiere al SNP¹⁴⁰ y ocurren aproximadamente una vez cada 1000 pares de bases. Diversos estudios los han asociado con la susceptibilidad y agresividad del cáncer¹⁴¹.

El gen VEGF está localizado en la posición 6p21.1 del cromosoma 6. Su región de codificación se extiende 14 kilobases y consta de 8 exones. Existen numerosos SNPs en el promotor y en las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR), tal y como se muestra en la siguiente figura, donde están representados los más frecuentes¹¹³:

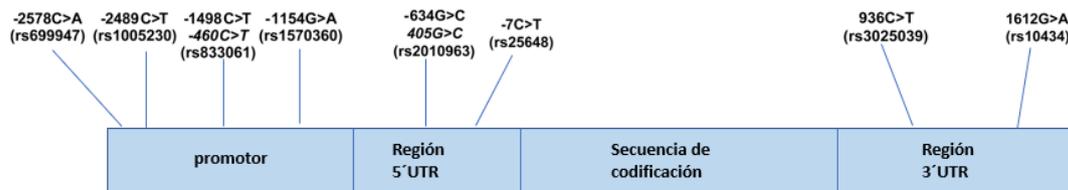


Figura 3. Estructura del gen VEGF y localización de sus polimorfismos. Adaptado de Jain y cols¹¹³.

Las regiones UTR 5' y 3' contienen elementos reguladores claves que son sensibles a la hipoxia y contribuyen a la gran variabilidad que hay en la producción de VEGF por los tejidos. Tal es el caso del polimorfismo -634G> C, que afecta a la eficiencia de la traducción de proteínas o el -936C> T, que influye en las concentraciones plasmáticas circulantes y en la expresión en tejido tumoral de VEGF¹¹³.

En este sentido, diferentes estudios han demostrado que SNPs de genes involucrados en las vías de angiogénesis dependientes de VEGF pueden afectar a la transcripción de genes facilitando la producción de factores angiogénicos (por ejemplo, VEGF) o formas solubles de sus receptores (por ejemplo, sVEGFR-2), causando así diferencias interindividuales en la capacidad angiogénica y en la resistencia a la terapia antiangiogénica¹⁴¹.

Además, diferentes SNPs de VEGF se han relacionado con el riesgo de cáncer y con el pronóstico de los pacientes con cáncer. Por ejemplo, en cáncer colorrectal, el alelo T del -936 C>T se ha asociado, por un lado, con un riesgo mayor de cáncer, con un estadio

avanzado de la enfermedad y con una supervivencia peor y, por otro lado, con un tiempo mayor a la recaída, aunque otros estudios no han encontrado relación ni con factores pronósticos como el tamaño, el grado o el estadio ni con la supervivencia. VEGF -2578 C>A no se ha vinculado ni con el riesgo de cáncer, ni con la supervivencia, ni tampoco con el tamaño tumoral o el estadio¹¹³. En cáncer de mama, los resultados para VEGF -2578 C>A y 936 C>T son inconsistentes, existiendo estudios que los han asociado con el riesgo de cáncer de mama y otros que no han encontrado diferencias significativas¹¹³.

El papel de estos polimorfismos determinados en línea germinal como predictores de respuesta a bevacizumab también es discutido.

Loupakis y cols., analizaron cuatro SNPs de VEGF en muestras de sangre periférica de 111 pacientes italianos con CCRm que habían recibido en primera línea FOLFIRI-bevacizumab y en 107 pacientes que habían recibido sólo FOLFIRI (grupo control), destacando al SNP VEGF -1498 C/T, puesto que el genotipo T/T se asoció con una disminución significativa de la SLP ($p=0.011$) en el grupo de pacientes con bevacizumab, sin encontrar correlación en el grupo control¹⁴². Ante estos hallazgos, realizaron un estudio prospectivo en una población similar ($n=424$) para valorar si el SNP VEGF -1498 C/T podía considerarse un factor predictivo de respuesta a bevacizumab sin encontrar diferencias entre los diferentes genotipos de dicho polimorfismo y SLP ($p=0.38$) ni SG ($p=0.95$)¹⁴³.

En población asiática, Sohn y cols., evaluaron 12 SNPs en sangre periférica en 125 pacientes coreanos provenientes de dos estudios fase II con CCRm en tratamiento de primera y segunda línea con QT-bevacizumab, observando que el genotipo T/T del polimorfismo 1498 VEGF se vinculó a una TR superior respecto a C/T y C/C (75.9 vs 50.8%; $p=0.008$). De los demás SNPs analizados también sobresalió el rs9513070 de VEGFR-1, dado que el A/A mostró un aumento en SLP y SG en comparación con G/A+G/G con medianas de 8.7 vs. 6.6 meses respectivamente para SLP (HR=0.50; $p=0.001$) y de 26.4 vs. 16.1 meses respectivamente para SG (HR=0.64; $p=0.038$)¹⁴⁴.

Formica y cols., determinaron 8 polimorfismos de VEGF en 40 pacientes dentro de un ensayo prospectivo con CCRm en primera línea con FOLFIRI-bevacizumab (el 95% fueron de raza caucásica), hallando que el genotipo G/G de VEGF 1154 (realizado en

sangre periférica) confirió un aumento de riesgo de progresión (G/G vs G/A+A/A HR=4.43; IC 95% 1.28-15.36, p=0.02), siendo el genotipo A/A el que presentó una SLP mayor. También constataron que el genotipo G/G de VEGF -634 presentó más TR frente al G/C y C/C (64% vs 14% respectivamente, p=0.03)¹⁴⁵. En la misma línea, un estudio del equipo griego de Koutras, analizó 5 polimorfismos de VEGF en muestras de sangre de 173 pacientes de un ensayo de fase III que comparó FOLFIRI-bevacizumab frente a XELIRI-bevacizumab en primera línea, observando que el genotipo G/G de VEGF-1154 fue el que se encontró con más frecuencia en los pacientes no respondedores (65.5 frente a 39.8%, p=0.032), asociándose a una mediana de SG menor en comparación con G/A y A/A (HR=1.62; IC 95% 1.09-2.40; p=0.017)¹⁴⁶.

En cáncer de mama, Etienne-Grimaldi y cols., realizaron un análisis de 5 SNP de VEGF tras extraer sangre de 137 pacientes francesas pertenecientes al estudio MO19391 que exploró la combinación de bevacizumab +/- taxano en primera línea de CMm o localmente avanzado HER2 negativo en la práctica asistencial, observando que aquellas con el genotipo C/C de -936 C>T presentaron un tiempo a la progresión menor (mediana 9.7 meses IC 95% 7.8-12) en comparación con los genotipos C/T y T/T (mediana de 11.5 meses, IC 95% 10-25.8; p=0.022)¹⁴⁷.

Sin embargo, en cáncer colorrectal, el grupo francés de Sibertin-Blanc y cols., observó resultados contradictorios tras analizar retrospectivamente a 89 pacientes con CCRm en tratamiento con QT-bevacizumab, al encontrar que el genotipo C/C de -936 VEGF (determinado en sangre o tejido sano) se asoció con un TFT mayor en comparación con los genotipos C/T y T/T (mediana de 14.2 vs 6 meses (p=0.022 en el análisis multivariante; HR=0.57; IC 95% 0.35–0.92). Los pacientes con al menos un alelo T tuvieron peor SG y SLP en comparación con los pacientes homocigotos C/C en el análisis univariante (p=0.016 y p=0.044 respectivamente)¹⁴⁸.

Hay otros estudios que han analizado polimorfismos del receptor de VEGF, como en el estudio fase III ACT, que puso de manifiesto tras analizar a 218 pacientes procedentes de Suecia o Dinamarca con CCRm en tratamiento de primera línea con QT-bevacizumab de forma prospectiva, que el polimorfismo VEGFR-1 319 C/A (rs9582036) en sangre periférica se correlacionó con la respuesta, de tal manera que se evidenció respuesta objetiva en el 36% de los pacientes con genotipo C/C, en el 40% con C/A y en el 56%

con A/A ($p=0.048$). La TR también difirió significativamente entre los pacientes con genotipo que contuvo el alelo C (CC+CA) (39%) y los pacientes homocigotos para el alelo A (AA) (56%) $p=0.015$ ¹⁴⁹.

En el congreso de ASCO 2012, Cremolini y cols., comunicaron en forma de póster, un análisis prospectivo con 424 pacientes donde concluyeron que, entre los SNP analizados en sangre periférica, sólo las variantes C de VEGFR-2 rs12505758 ($n=118$) se asociaron a una SLP menor en comparación con T/T ($n=306$) (HR=1.40; IC 95% 1.07-1.84; $p=0.015$). En el modelo multivariante, esta asociación conservó la significancia (HR=1.402, IC 95% 1.079-1.822; $p=0.012$), pero se perdió tras la aplicación de múltiples pruebas de corrección¹⁵⁰.

El estudio prospectivo de Loupakis comentado previamente que falló en confirmar el papel del SNP VEGF -1498 C/T, también analizó otros polimorfismos, mostrando unos resultados similares en relación al SNP rs12505758 de VEGFR-2, donde los genotipos con alelo C se asociaron a una SLP menor en comparación con el genotipo T/T (HR=1.36; IC 95% 1.05-1.75, $p=0.015$)¹⁴³.

Se han publicado otros estudios negativos al respecto. El primero de ellos, publicado por Loupakis en 2011, ya mencionado con anterioridad, que además de evaluar los niveles de VEGF, también estudió el impacto de 5 SNP de VEGF y 3 SNP de VEGFR-2 en 54 pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con FOLFOXIRI-bevacizumab sin encontrar resultados relevantes¹³⁵. Murphy y cols., presentaron unos datos parecidos en otro póster en ASCO 2012 tras un análisis retrospectivo con 403 pacientes con CCRm tratados con bevacizumab sin encontrar relación entre los 5 SNP de VEGF analizados y SG¹⁵¹.

Ante los resultados discordantes, Lambrechts y cols., realizaron un análisis combinado de los datos de 5 estudios; un total de 628 pacientes tratados con bevacizumab con CCRm (NO16966), cáncer de páncreas (AVITA), cáncer de pulmón no microcítico (AVAiL), cáncer renal (AVOREN) y cáncer de mama (AVADO), haciendo el genotipado en ADN germinal (sangre periférica) de un total de 158 SNPs localizados en VEGF-A, receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2) y factores inducibles de hipoxia (HIF-1a y EPAS1). El SNP rs699946 de VEGF-A se asoció con mejora de la SLP en los pacientes tratados con

antiangiogénico (HR alélica=1.27 (IC 95% 1.08-1.49, p=0.003), sin encontrar ningún efecto en los tratados con placebo. En términos de SG, el SNP rs12505758 de VEGFR-2 se relacionó con aumento de SG en los pacientes tratados con bevacizumab (HR alélica=1.50, IC 95% 1.21-1.85, p=0.0002) sin ver tampoco efecto en los pacientes con placebo, por lo que los autores sugieren que ambos polimorfismos podrían comportarse como factores predictivos de respuesta a bevacizumab¹⁵².

Hay que tener en cuenta que en la respuesta a los fármacos participan diferentes proteínas, como dianas terapéuticas, moléculas en la vía de señalización, enzimas metabólicas o transportadores de fármacos, lo cual puede hacer probable que el impacto de los polimorfismos en los genes correspondientes ejerza su influencia sólo en la presencia de otros polimorfismos. Así que, estudiar la interacción entre los polimorfismos podría proporcionar una información más fiable en comparación con un análisis por separado de asociaciones entre polimorfismos individuales y respuesta a tratamiento. En este sentido, Pander y cols., utilizando como metodología la reducción de dimensionalidad multifactorial estudiaron las interacciones entre 17 SNPs en 279 pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con XELOX-bevacizumab. Ninguno de los siete polimorfismos en VEGF (-1154G>A, -405G>C, -936C>T, -2578C>A, -460C>T) y su receptor (VEGFR-2 1719 A> T, -604T> C) se asociaron de forma individual con la SLP en el análisis multivariante. Sin embargo, un perfil de interacción genética entre los polimorfismos del potenciador de la región timidilato sintasa TYMS (TSER) y VEGF + 405G> C sí se asoció significativamente con la SLP con medianas de 13.3 (IC 95% 11.4–15.3) y 9.7 (IC 95% 7.6–11.8) meses para los perfiles genéticos favorables y desfavorables respectivamente (p<0.001)¹⁵³.

2.8 Sistema renina-angiotensina (SRA)

2.8.1 Generalidades

El SRA es una cascada de péptidos que juega un papel crucial en la regulación de la presión arterial y la homeostasis del sodio, regulando el equilibrio de fluidos y electrolitos a través de una coordinación entre corazón, vasos sanguíneos y riñones¹⁵⁴. La vía clásica del SRA comienza con la renina, que es una proteasa sintetizada en las granulaciones de las células yuxtglomerulares que rodean las arteriolas aferentes de los glomérulos renales y que se comportan como sensores de la presión de perfusión renal regulando la presión

arterial. La renina actúa sobre su único sustrato conocido, el angiotensinógeno (AGT), una globulina α_2 circulante formada en el hígado predominantemente (también se ha observado en tejido adiposo, cerebro, médula espinal, corazón, riñón, pulmón, glándula adrenal, intestino grueso, estómago, bazo, ovario y vasos sanguíneos)¹⁵⁵, dando lugar a la angiotensina I (AT-I), un decapeptido inactivo. La enzima convertidora de angiotensina (ECA), que se encuentra predominantemente en el endotelio de los vasos pulmonares (pudiendo estar también en el epitelio del túbulo proximal del riñón, en las células ciliadas del epitelio intestinal, en la placenta y en las células germinales del varón)¹⁵⁶, convierte a AT-I en el octapeptido activo, la angiotensina II (AT-II). AT-II es un potente vasopresor que actúa directamente sobre la musculatura de la fibra lisa arteriolar y además estimula la producción de aldosterona por la zona glomerular de la corteza suprarrenal, que aumenta la reabsorción de sodio y agua, lo que expande el volumen extracelular aumentando así la presión arterial¹⁵⁷. Se cree que ECA es responsable de al menos el 90% de la conversión de AT-I en AT-II en sangre, riñón, corazón, pulmón y cerebro¹⁵⁶.

La liberación de renina depende de cuatro factores independientes. Por un lado, como se comentaba previamente, las células yuxtaglomerulares detectan la presión de las arteriolas aferentes, de tal manera que si disminuye el volumen sanguíneo circulante, disminuye la presión de perfusión renal y por tanto en las arteriolas aferentes, liberándose, en respuesta, más renina a la circulación renal. Así se forma en última instancia más AT-II que influye en la homeostasis del sodio por dos mecanismos: modifica el flujo sanguíneo renal para mantener constante la filtración glomerular, cambiando por tanto la fracción de filtración de sodio y estimula la producción de aldosterona que aumenta la retención de sodio produciendo una expansión del volumen del líquido extracelular, lo cual a su vez amortigua la señal para que se inicie la liberación de renina. Un segundo factor que influye en la producción de renina lo constituyen las células de la mácula densa (grupo de células epiteliales del túbulo contorneado distal situadas frente a las células yuxtaglomerulares) que actúan como quimiorreceptores y, cuando la carga de sodio (o cloruro) presentada al túbulo distal es elevada, envían una señal a las células yuxtaglomerulares para que disminuyan la liberación de renina. También el sistema nervioso simpático regula la liberación de renina en respuesta a la bipedestación a través de un efecto directo sobre las células yuxtaglomerulares para que aumenten la actividad de la adenilciclase o un efecto indirecto sobre estas células o las de la mácula densa a través de la vasoconstricción de la arteriola aferente. Por último, hay factores circulantes

que participan, como AT-II que inhibe la liberación de renina por retroalimentación negativa, al igual que los péptidos natriuréticos o la ingesta de potasio que también pueden bloquear la secreción de renina¹⁵⁷.

En relación a ECA, aunque su principal acción es convertir AT-I en AT-II regulando el control de la presión sanguínea, en función del sustrato al que se une y su producto, posee funciones diferentes. Uno de los sustratos más importantes es la bradiquinina (vasodilatadora y natriurética), que ECA degrada y convierte en péptido inactivo¹⁵⁵. Así, los inhibidores de ECA (iECAs) contribuyen al control de la tensión arterial, además de disminuyendo AT-II, aumentando la concentración de bradiquinina. Otras funciones incluyen la hematopoyesis, la reproducción, el desarrollo renal, la función renal y la respuesta inmune¹⁵⁶ (participando en el procesamiento de los péptidos que se presentan al complejo mayor de histocompatibilidad clase I que se encarga de mostrar los péptidos antigénicos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos (CD8) y en diferentes fases de la respuesta inmune que son dependientes de AT-II: quimiotaxis, adhesión estromal y activación de LT).

Se han identificado homólogos de ECA, como ECA 2 que se expresa en la superficie de ciertas poblaciones de células endoteliales, principalmente en riñón, seguido de corazón y testículo, aunque hay trabajos que comentan su presencia en otros tejidos como el cerebro, tejido adiposo y páncreas. Al igual que ECA, ECA 2 hidroliza AT-I, pero con mucha menos actividad, actuando también sobre AT-II, generando AT (1-7), una molécula con siete aminoácidos biológicamente activa (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro). AT (1-7) actúa posteriormente sobre el receptor MAS y tiene varias acciones opuestas a AT-II, tales como la liberación de vasodilatadores como NO, PGE2 y bradiquinina, lo que indica que este péptido produce vasodilatación, natriuresis, y puede disminuir la presión sanguínea. También puede generarse directamente a partir de AT-I vía AT (1-9), una vía que es utilizada tanto por ECA 2 como ECA¹⁵⁵. También, de forma contraria a AT-II, AT (1-7) disminuye la inflamación, aumenta la apoptosis, es antiangiogénica y antiproliferativa¹⁵⁸. Se ha sugerido que AT (1-7) actúa como un regulador negativo de la producción de AT-II. Por tanto, el equilibrio entre ECA y ECA 2 es importante en la regulación de los niveles de AT-II¹⁵⁴.

La mayoría de los efectos de AT-II están mediados por el receptor de AT-II tipo 1 (AGTR-1), que se expresa en diferentes tejidos en el adulto, incluyendo vasos sanguíneos, corteza adrenal, hígado, riñón y cerebro¹⁵⁸. Dado que se expresa de forma abundante en el tejido cardiovascular, es el responsable de la mayoría de las acciones cardiovasculares de AT-II. Induce la migración de las células del músculo liso y monocitos y promueve la proliferación de las células endoteliales¹⁵⁹. Al activarse, induce la angiogénesis, proliferación celular y respuesta inflamatoria. Existe otro tipo de receptor denominado receptor de AT-II tipo 2 (AGTR-2), que es codificado por un gen diferente y que se expresa predominantemente en la etapa fetal, aunque también aparece en algunos tejidos en el adulto como la médula adrenal, útero y folículos ováricos, pero en concentraciones bajas. Antagoniza alguna de las acciones del AGTR-1, aunque existen datos que sugieren que la vía AGTR-2 también puede ser proangiogénica y proinflamatoria¹⁵⁸ (ver figura 4).

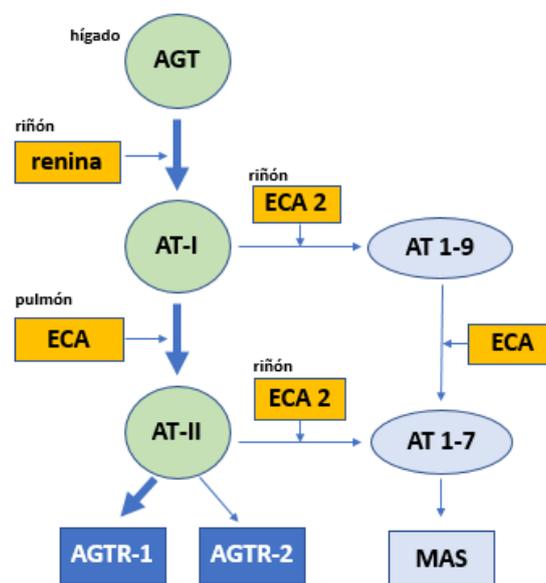


Figura 4: Componentes del sistema renina angiotensina (SRA). AGT: angiotensinógeno; AGTR-1: receptor de angiotensina II tipo 1; AGTR-2: receptor de angiotensina II tipo 2; AT-I: angiotensina I; AT-II: angiotensina II; ECA: enzima convertidora de angiotensinógeno.

2.8.2 SRA y cáncer

Cada vez hay más evidencia de que, además del SRA circulante, existe un SRA local o tisular en la mayoría de los órganos (incluido cerebro, corazón, vasos sanguíneos, glándulas adrenales y riñón) que genera AT-II que produce señales paracrinas y/o autocrinas dentro de los tejidos¹⁵⁴ y que puede influir en la angiogénesis, proliferación

celular e inflamación. En los seres humanos, el SRA circulante y local representan el 70-85% y el 15-30% de la función del SRA, respectivamente¹⁶⁰.

Se ha observado sobreexpresión de los componentes del SRA en tejido tumoral [(cerebro, pulmón, páncreas, mama, próstata, colon, piel, ovario y cérvix)¹⁵⁸ y estómago¹⁶⁰] en comparación con su correspondiente tejido normal. De hecho, en el paso de un fenotipo celular normal a uno maligno suele verse sobreexpresión del SRA y en particular de AGTR, lo cual sugiere una relación entre el SRA y la progresión tumoral¹⁵⁸. Se han estudiado ambos AGTR (1 y 2). En este sentido, Paepe y cols., observaron tras analizar 49 pacientes, un aumento de los niveles de AGTR-2 en la hiperplasia de mama, cuya expresión aumentó en la forma invasiva en comparación con el tejido de mama normal¹⁶¹. También en cáncer de mama, Tahmasebi y cols., encontraron un aumento de los niveles de AGTR-1 en relación con el tejido normal. No detectaron AGTR-2 en el tejido normal, estando claramente presente en el tumor. Confirmaron la presencia de otros componentes del SRA como AGT (en menor cantidad que en hígado sano), renina (en menor cantidad que en riñón sano) y ECA (en menor medida que en pulmón sano; lo cual podría ser debido a que constituyen las principales fuentes de producción de estos componentes)¹⁶². En cáncer de ovario, Suganuma y cols., constataron que la sobreexpresión de AGTR-1 se correlacionó con la agresividad del tumor tras examinar a 99 pacientes¹⁶³. En 133 pacientes intervenidos de astrocitoma, Arrieta y cols., hallaron un aumento de expresión de AGTR-1 y AGTR-2 en los tumores de alto grado en comparación con los de bajo grado. Además, los tumores con expresión de AGTR-1 mostraron mayor proliferación celular y densidad vascular con una tasa de supervivencia menor, sugiriendo que estos receptores podrían ser una diana terapéutica atractiva¹⁶⁴. En un modelo animal con ratones con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal, Neo y cols, observaron diferencias entre el SRA local tumoral y el SRA local del tejido hepático circundante, con una disminución de la expresión de AGTR-1 y un aumento de AT (1-7) y el receptor MAS en el tumor. La inducción del tumor condujo a un aumento inicial en la expresión de AGTR-1 y ECA, mientras que el bloqueo del SRA mediante un iECA (captopril), además de reducir el volumen tumoral de forma significativa, disminuyó la expresión de ECA inicialmente en el periodo de rápido crecimiento, aunque la aumentó en las fases finales del crecimiento tumoral, observando además una reducción en la expresión de AGTR-1 y AGT. Los autores concluyen que parece existir un SRA local tumoral que podría ser bloqueado de forma independiente por inhibidores del SRA¹⁶⁵.

AT-II estimula la expresión de varios factores proangiogénicos, así como factores de crecimiento como VEGF, angiopoetina 2 y b-FGF. El bloqueo de SRA se asocia con frecuencia con una disminución de la producción de VEGF. En modelos de angiogénesis inducida por hipoxia, AT-II promueve la revascularización aumentando VEGF, así como los niveles de la enzima eNOS por activación de AGTR-1. En cambio, AGTR-2 parece antagonizar estas acciones¹⁵⁸.

Por otro lado, AT-II promueve la expresión de factores de permeabilidad vascular como las prostaglandinas, NO, factor nuclear- kB (NF-kB) y endotelina. El SRA y el sistema de endotelina comparten más características aparte de sus propiedades vasoactivas, pudiendo causar hipertrofia, proliferación e inflamación en condiciones fisiológicas y patológicas. Se ha sugerido que el SRA puede contrarrestar los efectos del sistema endotelina y el balance de ambos es lo que determina el resultado¹⁵⁸.

AT 1-7 parece inhibir la angiogénesis y así se vio en un trabajo publicado por Machado y cols., donde en un modelo con ratones, AT 1-7 inhibió tanto la angiogénesis como la proliferación del tejido fibrovascular a través de una liberación de NO. Además, la administración de un antagonista del receptor de AT (1-7) o de inhibidores de la NOS previnieron dicha inhibición angiogénica¹⁶⁶.

Con respecto a ECA, aparte de generando péptidos de AT, también puede actuar de manera independiente a la cascada SRA-AGTR-1, como miembro de un conjunto de proteasas transmembrana involucrada en la degradación de la matriz extracelular, paso fundamental de la fase inicial de la angiogénesis¹⁶⁷. Como se comentaba previamente, cuenta con otros substratos como la bradiquinina, cuya acumulación estimula los receptores de bradiquinina (BR-1 y BR-2) sobre las células dentro del microambiente tumoral. La activación de BR-1 conduce a la regulación positiva de FGF y VEGF, que apoyan la angiogénesis y por lo tanto impulsan el crecimiento del tumor. Otro substrato de ECA es la sustancia P (neuroquinina liberada por neuronas sensoriales que media el dolor y la inflamación). La sustancia P activa el receptor de neuroquinina-1 (que se expresa en diferentes tumores), lo cual facilita la proliferación celular, angiogénesis, supervivencia celular y migración de las células tumorales para ser capaces de invadir y metastatizar. Cabe destacar a un tercer substrato, la Acetyl SDKP (N-acetyl-seryl-

aspartyl-lysyl-proline), que está aumentada en pacientes con cáncer y, aunque su papel en este sentido aún no se conoce, se cree que participa en la angiogénesis¹⁶⁷.

En definitiva, el SRA puede producir diferentes respuestas debido a la cantidad de péptidos y receptores y a las diferentes vías de señalización que puede inducir. Del balance de esas señales va a depender el fenotipo celular proliferativo y angiogénico que dependa del SRA¹⁵⁸.

Hay que tener en cuenta que las células tumorales no crecen aisladas, sino que precisan de un microambiente tumoral que facilite la proliferación tumoral, el escape del sistema inmune, el remodelado de la matriz así como el desarrollo de metástasis a distancia. Este microambiente lo componen monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, fibroblastos, células del estroma y células endoteliales y se ha observado que en todas ellas se expresan tanto ECA como otros componentes del SRA. Cabe destacar a los linfocitos T reguladores, puesto que se ha observado un aumento de los mismos infiltrando diferentes tumores, lo cual se ha asociado a un mal pronóstico. Estos linfocitos actúan suprimiendo la activación del sistema inmunitario, manteniendo así la homeostasis de este sistema y favoreciendo la tolerancia periférica. Además de ser capaces de suprimir el sistema inmune, facilitan la angiogénesis a través de la producción de citoquinas y VEGF interviniendo así en la progresión del cáncer¹⁶⁷.

El impacto del bloqueo del SRA en la incidencia y mortalidad por cáncer aún está sujeto a debate. Puesto que SRA puede participar en la tumorigénesis tal y como se ha mencionado, su inhibición se ha propuesto como una alternativa en el tratamiento de tumores sólidos. Por ello, se han llevado a cabo estudios con iECAs y antagonistas del receptor de AT-II (ARA-II), que son utilizados en la práctica clínica en el manejo de la HTA, insuficiencia cardíaca o prevención del riesgo cardiovascular. Por ejemplo, Menter y cols., en un análisis retrospectivo de pacientes con cáncer de pulmón de células grandes localmente avanzado o metastásico que recibieron QT en primera línea [carboplatino-paclitaxel (n=1465) o carboplatino-paclitaxel-bevacizumab (n=348)] estudiaron las diferencias en supervivencia entre aquéllos que recibieron de forma concomitante inhibidores del SRA (20% aproximadamente de cada grupo) frente a los que no, observando un aumento de supervivencia en los que recibían el tratamiento, aunque la asociación fue estadísticamente significativa sólo en el grupo de QT sin bevacizumab

(mediana de SG de 12 vs 8.4 meses HR=0.72; IC 95% 0.63-0.84)¹⁶⁸. En la misma línea, se han desarrollado estudios retrospectivos en pacientes con cáncer de páncreas¹⁶⁹, gástrico¹⁷⁰ o renal¹⁷¹ avanzado que sugieren resultados clínicos mejores en los pacientes que reciben inhibidores del SRA. Recientemente, Sun y cols., han publicado un metaanálisis que muestra una mejora de SG (HR=0.82; IC 95% 0.77-0.88; p<0.001), SLP (HR=0.74; IC 95% 0.66-0.84; p<0.001) y SLE (HR=0.80; IC 95% 0.67-0.95; p=0.01) a favor de los pacientes en tratamiento con inhibidores de SRA¹⁷². Sin duda, se necesitan estudios prospectivos y a gran escala para confirmar estos resultados.

También se ha evaluado la relación entre el bloqueo del SRA y la incidencia de cáncer. En 1998 Lever y cols., llevaron a cabo un estudio retrospectivo con 5207 pacientes observando que la incidencia de cáncer se redujo en pacientes tratados con iECA durante más de tres años¹⁷³. Desde entonces, se han publicado más estudios explorando este campo con resultados discordantes que pueden atribuirse a los diferentes grupos de población incluidos, diferentes tipos de cáncer, así como los fármacos y sus dosis empleadas. En 2008, Coleman y cols., realizaron un metaanálisis con estudios randomizados aleatorizados controlados (placebo, control activo o control sin tratamiento) con fármacos antihipertensivos concluyendo que los fármacos antiHTA no se asociaron con una probabilidad mayor de desarrollar cáncer en comparación con el grupo placebo/no tratado como comparación de referencia con unos valores de HR para iECA 0.99 IC 95% 0.80-1.24 y de HR para ARA-II 1.12 IC 95% 0.87-1.47¹⁷⁴. Sin embargo, en 2010, Sipahi y cols., hicieron otro metaanálisis que incluyó ensayos controlados aleatorizados con ARA-II administrados en al menos un grupo, con un seguimiento de al menos un año con un mínimo de 100 pacientes incluidos, observando que los que recibieron ARA-II presentaron un aumento de riesgo de padecer cáncer, modesto pero significativo (7.2% vs 6%, razón de riesgo [RR] 1.08, IC 95% 1.01-1.15; p=0.016). Si bien es cierto que la variación en la magnitud del efecto con la duración de la exposición al fármaco, así como la importancia de estos hallazgos a nivel de la población, son desconocidas¹⁷⁵. Por último, cabe reseñar un tercer metaanálisis publicado en 2016 por Shen y cols., con ensayos controlados aleatorizados y observacionales (estudios de casos y controles y estudios de cohortes) con iECAs y ARA-II con un seguimiento mínimo de un año, que mostró una incidencia menor de cáncer en los estudios observacionales (RR=0.82; IC 95%: 0.73-0.93), pero no en los ensayos controlados aleatorios (RR=1.00; IC 95%: 0.92-1.08)¹⁷⁶.

2.8.3 Polimorfismos del SRA

- Polimorfismo de inserción/delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (rs1799752 o rs4646994)

Las concentraciones plasmáticas y tisulares de ECA, y por lo tanto los niveles de AT-II, están determinadas en parte por el gen ECA, que se encuentra en el cromosoma 17q23. En 1990, Rigat y cols., identificaron un polimorfismo consistente en la presencia o ausencia de un fragmento de ADN de 287 pares de bases en el intron 16 del gen de la ECA; un polimorfismo de inserción (I) o delección (D) y por lo tanto tres genotipos (DD, II e ID). La frecuencia alélica fue de 0,4 para la inserción (I) y de 0,6 para la delección (D). Estos genotipos se correlacionaron con las concentraciones séricas de ECA, de tal manera que el genotipo DD se asoció a niveles séricos mayores (promedio de 494.1 +/- 88.3 µg/l), que ID (392.6 +/- 66.8 µg/l) y que II, el cual presentó los valores más bajos (299.3 +/- 49 µg/l). Se concluyó que el polimorfismo I/D era responsable del 47% del total de la varianza de ECA en suero, mostrando que el locus del gen ECA es el locus principal que determina la concentración de ECA sérica^{177,178}.

Como paso adicional para probar la hipótesis de que niveles menores de ECA protegen del cáncer, el grupo de Koh fue el primero en observar en una cohorte prospectiva de mujeres chinas en Singapur que las portadoras de genotipos que predisponen a concentraciones menores de ECA en suero (genotipos ID, II del polimorfismo I/D y genotipos AA y AT del polimorfismo A240 T) tuvieron un riesgo significativamente reducido de cáncer de mama (OR=0.46 IC 95% 0.27-0.81)¹⁷⁹.

Por su parte, el grupo de Alves Corrêa mostró que las portadoras del genotipo ID tuvieron 3.1 veces menos probabilidades de desarrollar cáncer de mama que aquéllas con genotipos II/DD en población brasileña (p=0.0179 y 0.0005 respectivamente, en comparación con DD y II)¹⁸⁰.

Considerando otros tumores primarios, en estadios precoces de cáncer gástrico (88 pacientes con cáncer y 145 controles), Ebert y cols., también documentaron que el genotipo II se asoció a un riesgo menor de padecer cáncer gástrico en comparación con el genotipo DD en población europea (OR para el genotipo II 0.20; IC 95% 0.08-0.54;

p=0.009; OR 0.55 para el genotipo ID/II; IC 95%, 0.31–0.96; p=0.044) utilizando el genotipo DD como la categoría de referencia¹⁸¹.

Otro estudio con mayor número de pacientes realizado en una cohorte prospectiva basada en la población del estudio epidemiológico de Rotterdam, publicado por van der Knaap y cols. en 2008, exploró la relación entre los genotipos de ECA y el riesgo de cáncer colorrectal, pulmón, mama y próstata (6670 participantes durante una media de seguimiento de 9.6 años), encontrando que ser portador del genotipo DD se correlacionó con un riesgo mayor de cáncer de mama en comparación con los genotipos II/ID (HR=1.47 IC 95% 1.05–2.04), sin encontrar asociación en el resto de tumores. Aquéllos con genotipo DD (que se asocia a niveles altos de ECA) que recibieron inhibidores del SRA a dosis altas (superior a la dosis media diaria definida por la OMS) y durante un periodo prolongado (más de dos años) presentaron un riesgo menor de cáncer (HR=0.28 IC 95% 0.10-0.79) sugiriendo que los inhibidores de SRA podrían proteger a los pacientes con genotipo DD de desarrollar cáncer. Sin embargo, los portadores de genotipos II/ID que recibieron inhibidores del SRA a dosis altas tuvieron un riesgo mayor de progresión de cáncer colorrectal a corto plazo¹⁸².

De forma similar, Fishchuk y cols., observaron que el alelo D se relacionó con un aumento de riesgo de desarrollar cáncer de mama, pero en el grupo de edad entre 36-54 años (OR=3.44 IC 95% 1.60-7.37) tras analizar a 131 mujeres con cáncer de mama precoz y 102 controles en población ucraniana¹⁸³.

Sin embargo, en un estudio de cohortes multiétnico que incluyó afroamericanos, japoneses, latinos y blancos con un total de 1263 casos con cáncer de mama invasivo y 2269 controles, se encontró que las mujeres con genotipo II tuvieron un aumento marginalmente significativo de riesgo de cáncer de mama (II vs DD: OR=1.30 IC 95% 1.05–1.61), aunque las asociaciones no fueron totalmente consistentes entre los grupos étnicos, observándose una vinculación más fuerte entre las afroamericanas (II vs DD: OR=1.76 IC 95% 1.15-2.68) y sin encontrar relación en el grupo japonés (II vs DD: OR=1.04 IC 95% 0.62-1.75)¹⁸⁴.

En población caucásica, Freitas-Silva y cols., constataron que la presencia del alelo I en mujeres normotensas (TA<140/90) se asoció a un riesgo mayor de cáncer de endometrio

a una edad más temprana (antes de los 63 años) [OR=3.60, IC 95% 1.03-12.56; p=0.037] tras analizar a 171 mujeres (70 casos y 101 controles)¹⁸⁵.

Pero también se disponen de estudios negativos, como el de Hibi y cols., que no encontró relación entre el polimorfismo I/D de ECA y el riesgo de cáncer gástrico en población japonesa (583 pacientes y 1742 controles)¹⁸⁶.

Ante estos resultados discordantes, Xi y cols., realizaron un metaanálisis en 2011 sin ver asociación entre el polimorfismo I/D y el riesgo de cáncer de mama¹⁸⁷.

Sin embargo, el mismo año se publicó otro metaanálisis por Ruitter y cols., que incluyó otros tumores primarios (gástrico, colorrectal, próstata, pulmón y mama) y sí halló asociación significativa entre el alelo D del polimorfismo I/D de ECA y un aumento del riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (basado en 2 estudios) [OR=0.65 IC 95% 0.53-0.79 p=0.006] y en cáncer de próstata [OR=0.77 IC 95% 0.64-0.92 p=0.035], aunque no fue así cuando se analizaron todas las poblaciones combinadas¹⁸⁸.

Posteriormente, Yang y cols., llevaron a cabo un metaanálisis centrado en el cáncer digestivo sin encontrar diferencias significativas en el análisis global. En el grupo de los controles, el alelo I pareció ser un factor protector de cáncer gástrico (OR=0.87, IC 95% 0.75-1.00, p=0.055)¹⁸⁹.

- Polimorfismo A1166C del gen del receptor de angiotensina II tipo 1 (AGTR-1) (rs5186)

El gen de AGTR consta de cinco exones y se expande más de 55 kb en el cromosoma 3q21-25. Hasta la fecha, se han identificado un gran número de polimorfismos¹⁹⁰.

Bonnardeaux y cols. detectaron en 1994 la presencia de una sustitución de la base adenina por citosina en la posición 1166 (A1166C) en la región 3'UTR que se asoció con un aumento de la frecuencia de HTA esencial¹⁹¹. Estudios posteriores han mostrado resultados contradictorios, por lo que Niu y cols., en 2010 desarrollaron un metaanálisis concluyendo que dicho polimorfismo confería un riesgo mayor de HTA (OR=1.14 IC 95% 1.00-1.30; p=0.05)¹⁹⁰. Aparte, se ha relacionado con el cáncer, habiéndose realizado la mayoría de los estudios en cáncer de mama.

Algunos de los trabajos comentados previamente, además de explorar el polimorfismo I/D de ECA, también analizaron el polimorfismo A1166C de AGTR-1. Fishchuk y cols., mostraron que la presencia del genotipo AC elevó el riesgo de desarrollo de cáncer de mama en el grupo de mujeres mayores de 54 años (OR=3.09 IC 95% 1.09-8.75)¹⁸³. En cambio, Alves Correa y cols., no encontraron asociación con el riesgo de cáncer de mama (p=0.114)¹⁸⁰.

El metaanálisis de Xi, también mencionado, que incluyó dos estudios con el polimorfismo A1166C de AGTR-1 en el análisis, mostró que el genotipo homocigoto CC podría ser un factor protector del desarrollo del cáncer de mama en población caucásica (CC vs AA: OR=0.31 IC 95% 0.10-0.99)¹⁸⁷.

En 2015 se publicaron dos metaanálisis más al respecto en cáncer de mama. El primero de ellos, de Chen y cols., mostró que el alelo C se relacionó con una disminución del riesgo de cáncer de mama en población caucásica (C vs A: OR=0.77, IC 95% 0.62-0.96, p=0.02). Sin embargo, no encontraron asociación entre ningún genotipo y el riesgo de cáncer de mama (AC+CC vs. AA: OR=0.78, IC 95%: 0.50-1.22, p=0.28; CC vs. AA+AC: OR=1.64, IC 95%: 0.94-2.85, p=0.08)¹⁹². El segundo metaanálisis por Li y cols., no mostró asociación significativa entre el polimorfismo del gen AGTR1 A1166C y el riesgo de cáncer de mama¹⁹³.

Sin embargo, en cáncer renal, Deckers y cols., en parte de una cohorte prospectiva de población caucásica (3583 participantes con 503 casos de cáncer), observaron que el genotipo CC vs AA aumentó el riesgo de cáncer (HR=1.49 IC 95% 1.08-2.05)¹⁹⁴.

- Polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno (AGT) (rs699)

El gen AGT se localiza en el cromosoma 1q42-q43. El polimorfismo más estudiado es el M235T (en el exón 2), que consiste en la sustitución de una metionina por una treonina en la posición 235 de la secuencia del aminoácido. Esta variante se relaciona con una mayor concentración de AGT en plasma¹⁹⁵ y además el alelo T se ha asociado con un aumento del riesgo de HTA¹⁹⁶. Por otra parte, se ha sugerido que juega un papel importante en la etiología y progresión del cáncer.

González-Zuloeta y cols., en una cohorte de 3527 mujeres postmenopáusicas del estudio de Rotterdam, observaron un aumento del riesgo de cáncer de mama en las portadoras del genotipo MM versus las portadoras del alelo T (OR=1.4 IC 95% 1.1-1.9). Además, la supervivencia libre de cáncer de mama fue significativamente menor en las portadoras del genotipo MM en comparación con las no portadoras (HR=1.5 IC 95% 1.1-2.2)¹⁹⁷.

En cambio, Mendizabal-Ruiz y cols., que observaron una disminución de cáncer de mama en las pacientes herocigotas (p=0.048), no encontraron asociación significativa entre el genotipo MM frente a MT+TT (determinados en tejido) y el riesgo de cáncer al comparar pacientes con cáncer de mama con la población general (OR=1.97 IC 95% 0.87-4.42)¹⁹⁸.

El metaanálisis de Xi, que incluyó ambos estudios, mostró una asociación significativa entre el polimorfismo AGT M235T y el riesgo de cáncer de mama en población caucásica (OR=1.45, IC 95% 1.12-1.88)¹⁸⁷.

Posteriormente, Fishchuk y cols., mostraron que el genotipo TT se asoció con un aumento del riesgo de cáncer de mama en pacientes mayores de 54 años (OR=4.09 IC 95% 1.33-12.51)¹⁸³.

Ante la inconsistencia de los resultados, otro metaanálisis en 2015 por Lin y cols., que incluyó otros primarios, concluyó que la variante AGT M235T no se relacionó con el riesgo de cáncer dado que se observó un aumento marginal del riesgo (OR=1.12, IC 95% 1.02-1.24) que desapareció tras un análisis de sensibilidad. En un análisis adicional de subgrupos por tipo de cáncer, tampoco se observó ninguna asociación con AGT M235T (todos p>0.05)¹⁹⁹.

En el estudio de Deckers y cols. mencionado, también se analizó el polimorfismo AGT M235T sin observar asociación entre ningún genotipo y el riesgo de cáncer renal¹⁹⁴.

2.9 Otros polimorfismos relacionados con la HTA

2.9.1 Polimorfismos de los receptores β -adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos son miembros de la familia de receptores acoplados a la proteína G que miden las respuestas fisiológicas a la norepinefrina y adrenalina. Se dividen en tres familias principales ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y β) en función de su estructura y mecanismos de señalización. En concreto, los receptores β [que se dividen en $\beta 1$ (ADRB1), $\beta 2$ (ADRB2), $\beta 3$ (ADRB3)] se expresan en el corazón ($\beta 1$ y algunos $\beta 2$ mediando la contracción), en el músculo liso ($\beta 2$, induciendo la relajación) y en el músculo esquelético o estriado ($\beta 2$, induciendo la hipertrofia). Los receptores $\beta 2$ se expresan generalmente en todas las células del tejido normal. Los receptores $\beta 3$ se expresan principalmente en el tejido adiposo, controlando la lipólisis y en el músculo esquelético, donde contribuyen a la termogénesis²⁰⁰.

Se cree que la influencia del sistema b-adrenérgico sobre el metabolismo y el sistema inmune regula la capacidad de metastatizar del cáncer²⁰¹. Diferentes estudios han sugerido que los pacientes que reciben antagonistas de estos receptores (prescritos para enfermedades cardiovasculares o ansiedad) presentan tasas más bajas de varios tipos de cáncer y su empleo en pacientes con cáncer se ha asociado con un aumento de SG y SLE²⁰². Se ha documentado que los receptores β , son más prevalentes en la patogénesis del cáncer que los receptores α . De hecho, los tres subtipos del receptor b-adrenérgico están presentes en muchos tumores, incluido el cerebro, pulmón, hígado, riñón, glándula suprarrenal, mama, ovario, próstata, tejidos linfoides, médula ósea y vasculatura²⁰¹ y se asocian con múltiples vías de transducción de señales intracelulares implicadas en la replicación celular, inflamación, angiogénesis, apoptosis, motilidad celular, activación de tumores asociados a virus, reparación de daños en el ADN, respuesta inmune y en la transición epitelial-mesenquimal²⁰⁰.

ADRB1 juega un papel importante en la mediación de la transducción de señales del sistema simpático-adrenal. Uno de sus polimorfismos más importantes es el del codón 389, denominado rs1801253 (Gly389Arg) que está causado por el cambio de C a G (1165C>G) que sustituye a una arginina por una glicina en la región C-terminal del receptor. Se ha relacionado con HTA e insuficiencia cardíaca²⁰³.

Se han encontrado dos polimorfismos del gen de ADRB2; uno en el el codón 16, sustituyendo arginina por glicina (Arg16Gly) denominado rs1042713, y otro en el codón 27, sustituyendo el ácido glutámico por glutamina (Gln27Glu) denominado rs1042714. Ambos se han relacionado con la obesidad y en consecuencia con un aumento del riesgo de cáncer.

También se ha identificado otro polimorfismo del gen de ADRB3: una mutación en el codón 64, con reemplazo de triptófano por arginina (Trp64Arg) denominado rs4994. Se ha vinculado con un aumento del índice de masa corporal, con una edad temprana de inicio de diabetes mellitus no insulino dependiente, así como con características clínicas del síndrome de resistencia a la insulina y aumento de riesgo de cáncer²⁰³. En este sentido, Takezaki y cols., observaron que el SNP Trp64Arg se asoció con un aumento del riesgo de cáncer de colon en pacientes japoneses obesos (OR=2.63; IC 95% 1.13-6.11) tras analizar 131 casos y 239 controles, sin encontrar asociación con el polimorfismo Gln27Glu²⁰⁴. Pero, en cáncer de mama, también en población japonesa (200 casos y 182 controles), Huang y cols., exploraron los genotipos de ADRB2 y ADRB3 observando que ser portadora del alelo Glu ADRB2 confirió una disminución del riesgo de cáncer de mama en el subgrupo de mujeres con el primer hijo a una edad menor de 25 años (OR=0.35; IC 95% 0.13-0.99)²⁰⁵. Sin embargo, Feigelson y cols., no encontraron asociación entre los genotipos ADRB2 y 3 y el riesgo de cáncer de mama en población caucásica²⁰⁶. Tampoco, Wang y cols., observaron relación entre los diferentes genotipos del polimorfismo Arg16Gly de ADRB2 y el riesgo de cáncer de pulmón en población china (313 casos y 321 controles)²⁰⁷. En cambio, en cáncer de páncreas (173 casos y 476 controles), Zhang y cols, constataron un aumento de riesgo en los portadores del genotipo de glicina/arginina o arginina/arginina del polimorfismo rs1042713 de ADRB2 en comparación con el genotipo glicina/glicina (OR=1.52; IC 95% 1.01- 2.31) en población estadounidense²⁰⁸.

2.9.2 Polimorfismos de genes relacionados con el manejo renal de sodio

Las proteínas G son hetero-trímeros compuestos por subunidades α , β y γ , que actúan como interruptores para la transducción de señales desde el espacio extracelular al interior de la célula a través de su interacción con receptores acoplados a proteína G. La subunidad β juega un papel importante en la regulación de la subunidad α y de varios receptores y efectores de la señal de transducción. El gen GNB3 es uno de los cinco genes identificados

en el genoma humano que codifican una subunidad beta de proteína G²⁰⁹. Los genes que codifican las subunidades de la proteína G pueden estar involucrados en la patogénesis de la HTA dado que sus productos son efectores intracelulares de muchas hormonas vasoconstrictoras, como la AT-II y la endotelina. Uno de los polimorfismos más estudiados del gen GNB3 es el C825T (rs5443), que consiste en una sustitución de una citosina por una timina en la posición 825 en el exón 10, que condiciona un aumento de la actividad del transportador sodio/protrón lo que contribuiría al desarrollo de HTA. Además de con la HTA (se ha descrito una asociación entre el alelo T y la HTA), se ha asociado con hipertrofia ventricular izquierda, obesidad y resistencia a la insulina²¹⁰.

2.9.3 Polimorfismos del gen de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS)

Como ya se ha comentado, el NO es un vasodilatador importante que juega un papel bien establecido en la homeostasis del sistema cardiovascular gracias a su producción en mayor medida por la eNOS (también denominada NOS3), codificada por el gen NOS3. Se han identificado varios polimorfismos del gen NOS3 (ubicado en el cromosoma 7q36) que pueden influir en la expresión o actividad de la NOS3, y por tanto en la formación de NO. De ellos, cabe destacar dos SNPs. El primero de ellos, rs2070744 (786T>C) que consiste en la sustitución de timina por citosina en la posición 786 del promotor de NOS3 que conlleva a una disminución de la actividad transcripcional de la actividad de la NOS3. El segundo SNP, rs1799983 (Glu298Asp) se encuentra en el exón 7 y aparece tras el cambio de una guanina por una timina en la posición 894 del gen NOS3, dando como resultado una sustitución de glutamina por aspartato en la posición 298 de la proteína. El alelo Asp reduce la unión de NOS3 a la caveolina-1, lo que resulta en una disminución de la disponibilidad de NOS3 en su fracción caveolar en las células endoteliales y por lo tanto una reducción de la producción de NO²¹¹. Parece que el NO es crítico para la actividad antitumoral del sistema inmunológico así como en el estrés oxidativo, angiogénesis y desarrollo de metástasis. La influencia de los SNPs previamente mencionados en el riesgo de desarrollo de cáncer está sujeta a debate. Hefler y su equipo en 2006 observaron, tras analizar 269 pacientes con cáncer de mama y 244 controles en población caucásica, que el polimorfismo Glu298Asp (rs1799983) se asoció con el riesgo de cáncer de mama (OR=1.9; IC 95% 1.1-3.6), p=0.03²¹². Posteriormente, el grupo de Royo genotipó dicho polimorfismo en 440 pacientes con cáncer de mama y 321 controles en población española, aunque sin encontrar relación con el riesgo de cáncer de mama²¹³.

En cáncer colorrectal, Arikan y cols., pusieron de manifiesto, después de realizar el genotipado en 84 pacientes con cáncer y 99 controles en población turca, que los portadores del alelo G del polimorfismo Glu298Asp tuvieron un riesgo mayor de cáncer en comparación con el alelo T ($p=0.006$)²¹⁴. En población coreana, Jang y cols., hallaron que los genotipos TC y CC del polimorfismo -786T>C (en comparación con el genotipo TT), así como los genotipos GT y TT del polimorfismo 894G>T (en comparación con el genotipo GG), se vincularon con un aumento de riesgo de cáncer colorrectal ($p=0.008$ y $p=0.014$ respectivamente) tras haber analizado 528 pacientes con cáncer y 509 controles sanos²¹⁵. Sin embargo, Conde y cols., que estudiaron los dos polimorfismos mencionados de NOS3, no encontraron asociación entre éstos y la susceptibilidad al cáncer colorrectal en población española con 360 pacientes con cáncer y 550 controles²¹⁶. Todo ello motivó al grupo de Zhang a llevar a cabo un metaanálisis en 2014, sin encontrar relación entre el polimorfismo Glu298Asp y el riesgo de cáncer, aunque el análisis por subgrupos en función de la localización del primario, sugirió que el genotipo TT aumentó la susceptibilidad de riesgo de cáncer de mama (TT vs GT+GG, OR=1.31; IC 95% 1.07-1.62). Por otra parte, el genotipo CC del T786C, sí se correlacionó con un riesgo mayor de cáncer (CC vs. TC+TT: OR=1.31; IC 95% 1.09-1.57). En el análisis de subgrupos por origen étnico, la asociación significativa sólo se observó en caucásicos y, en el análisis por tipos de cáncer, la significancia apareció en el cáncer de mama. No obstante, los autores destacan como limitaciones del estudio un posible sesgo de publicación (pudiendo faltar trabajos con resultados negativos no publicados) así como la ausencia de datos en algunas publicaciones como el control de calidad de los métodos de genotipado, recomendando así interpretar con cautela las conclusiones, especialmente las derivadas del análisis por subgrupos debido a contar con menos estudios y por tanto con menos datos²¹⁷.

Teniendo en cuenta la importancia del SRA, así como de otros polimorfismos de genes relacionados con la HTA y con la angiogénesis, quisimos explorar su relevancia clínica en los pacientes con cáncer colorrectal y de mama avanzado.

3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS: Modificaciones constitutivas en el SRA determinan la respuesta y evolución a la terapia antiangiogénica.

OBJETIVOS:

Objetivo primario:

Analizar la relación entre polimorfismos del SRA y otros genes vinculados con la HTA y con la angiogénesis y la respuesta al tratamiento antiangiogénico (bevacizumab) en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama avanzado.

Objetivos secundarios:

Explorar si los niveles circulantes de ECA y VEGF-A se relacionan con la respuesta al tratamiento con bevacizumab.

Explorar si el desarrollo de HTA se asocia a unos resultados mejores en esta población de pacientes.

4.PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Pacientes

En este estudio longitudinal retrospectivo-prospectivo se incluyeron 232 pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal o de mama avanzado que fueron valorados y tratados por el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS) de Córdoba entre mayo de 2010 y mayo de 2015.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad superior a 18 años, haber recibido o encontrarse en tratamiento con bevacizumab, que se dispusiera de material biológico para llevar a cabo el análisis de polimorfismos asociados a hipertensión arterial (HTA), disponibilidad de información clínica, así como disponibilidad para el seguimiento.

El Comité Ético de Investigación Clínica de Córdoba y la Subcomisión de Investigación Sanitaria del HURS aprobaron este estudio en la reunión celebrada el 11 de Mayo 2010 (acta número 6) (ver anexo 1).

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado de forma previa a la inclusión en el estudio y a la extracción de las muestras (ver anexo 2: consentimiento informado; anexo 3: documento de solicitud de extracción de muestra).

4.2 Material

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes incluyendo en la hoja individual de recogida de datos los correspondientes a datos de filiación, características del paciente, características del tumor y características del tratamiento recibido (ver tabla 6). El tratamiento de los datos se realizó de acuerdo a la normativa vigente del RD 223/2004 de 6 de Febrero y la Ley Organica 15/1999 de 13 de diciembre sobre la protección de datos de carácter personal.

Para evaluar la respuesta a los tratamientos, nos basamos en los criterios RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors): respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), progresión (PE), enfermedad estable (EE) (ver anexo 4)²¹⁸. A partir de los datos obtenidos se elaboraron nuevas variables a las que hemos denominado: tasa de respuestas globales (TRG) que hace referencia a la suma de RC, RP y EE; supervivencia

global (SG), que abarca desde la fecha del inicio de tratamiento con bevacizumab hasta la fecha de la última visita en los pacientes no fallecidos y la fecha de exitus para los fallecidos; tiempo al fallo de tratamiento (TFT), que comprende desde el inicio de tratamiento con bevacizumab hasta el final del mismo, considerando fallo al tratamiento cuando fue suspendido por progresión o toxicidad. Para explorar el desarrollo de HTA en nuestra muestra, se creó una nueva variable “HTA 2” dividiendo a los pacientes en: no HTA, presencia de HTA previa al inicio del tratamiento, no HTA previa y sí durante el tratamiento antiangiogénico, considerando como HTA cifras de TAS>150 y/o TAD>90 mmHg.

4.3 Método

4.3.1 Experimentación clínica

4.3.1.1. Genotipado

Para el genotipado de los distintos polimorfismos, el ADN genómico fue purificado a partir de sangre periférica con el MagNA Pure LC 2.0 Instrument (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) utilizando el MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics).

Posteriormente, se realizó el genotipado de los siguientes polimorfismos utilizando sondas SimpleProbe en Light-Cycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics): VEGF -2578 C/A (rs699947), VEGF -1498 C/T (rs833061), VEGFR-1 (o FLT; rs9582036), AGTR1 A1166C (rs5186), AGT M235T (rs699), ECA I/D (rs1799752 o rs4646994), ADRB1 Gly389Arg (rs1801253), ADRB2 Arg16Gly (rs1042713), ADRB2 Gln27Glu (rs1042714), ADRB3 Trp64Arg (rs4994), GNB3 825 C>T (rs5443), NOS3 -786T>C (rs2070744), NOS3 Glu298Asp (rs1799983).

4.3.1.2. ELISA

Los niveles circulantes de VEGF y ECA en las muestras de plasma se analizaron usando los correspondientes kits humanos de ELISA de VEGF-A (Human VEGF-A, Platinum ELISA, eBioscience, San Diego, CA, USA) y de ECA (ACE Human ELISA kit, Abcam, Cambridge, UK).

Considerando que los niveles de ECA se correlacionan con los de angiotensina²¹⁹, hemos realizado la medición de ECA por ser ésta más estable en sangre.

4.3.1.3. Análisis estadístico

La base de datos se elaboró utilizando el sistema informático de análisis estadístico SSPS Statistics versión 19.0.

En el análisis descriptivo se tuvieron en cuenta valores de media, mediana, cuartiles (Q25-Q75) y rango para variables cuantitativas y valores de frecuencias absolutas y porcentajes para variables cualitativas.

Para el estudio del equilibrio de Hardy–Weinberg de los polimorfismos incluidos se utilizó el test estándar X^2 con 1 grado de libertad.

La comparación entre los diferentes polimorfismos con la TRG de bevacizumab; con los niveles de ECA ($<$ ó ≥ 135 ng/mL) y con el desarrollo de HTA durante el tratamiento antiangiogénico, así como ésta con la TRG o con los niveles ECA ($<$ ó ≥ 135 ng/mL) se llevó a cabo a través de tablas de contingencia con análisis de significación estadística mediante chi-cuadrado o test de Fisher (en casos de menor tamaño muestral).

Para asociar los niveles de VEGF-A con los distintos polimorfismos o con el desarrollo de HTA durante el tratamiento con bevacizumab se empleó el test no paramétrico Kruskal Wallis.

Para relacionar los niveles de VEGF-A en sangre con la TRG se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney.

El análisis entre los diferentes polimorfismos, el desarrollo de HTA durante el tratamiento con bevacizumab o los niveles circulantes de VEGF-A y ECA en plasma y el TFT y la SG se realizó mediante el método de Kaplan–Meier y el test de log-rank, empleándose la regresión de Cox para añadir la razón de riesgo o hazard ratio (HR).

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de $p < 0.05$ ²²⁰.

Se han elaborado gráficos y tablas que facilitan la interpretación de los resultados obtenidos.

*Cálculo de tamaño muestral: La hipótesis de nuestro estudio es que la presencia de polimorfismos relacionados con HTA es un factor predictivo de respuesta a tratamiento con antiangiogénicos. Por tanto, el TFT esperado en nuestra muestra de pacientes seleccionados en tratamiento con antiangiogénico en la indicación aprobada sería similar a la obtenida en los estudios publicados. La mediana de TFT publicado en otras series para diferentes neoplasias oscila entre 6 y 11 meses. Para detectar diferencias en la mediana de TFT $>30\%$ (2-3 meses) en función de la presencia o no del polimorfismo (variable principal) con un poder estadístico del 80% y un error alfa $< 5\%$, se necesitarían 40 pacientes con el polimorfismo. Teniendo en cuenta las frecuencias alélicas menores conocidas para los polimorfismos a estudiar se necesitarán un total de 200 pacientes. Asumiendo un 15% de pérdidas, bien porque haya una pérdida de seguimiento o porque la muestra no sea evaluable para el estudio del polimorfismo, necesitaríamos 230 pacientes (calculado según Pita Fernández S)²²¹.

Datos de filiación:

- Nombre¹
- Número de historia clínica general
- Número de historia clínica oncológica

Características del paciente:

- Fecha de nacimiento
- Sexo: mujer/hombre
- Peso (kg)
- Talla (cm)
- Síndrome metabólico previo al diagnóstico: sí/no
- Patología previa:
 - o Diabetes Mellitus
 - o HTA
 - o Otras
 - o No patología
- Tratamientos crónicos
- Tratamiento antihipertensivo previo al tratamiento con bevacizumab
 - o control sin tratamiento farmacológico
 - o 1 fármaco antihipertensivo
 - o 2 fármacos antihipertensivos
 - o 3 fármacos antihipertensivos
 - o 4 fármacos antihipertensivos
- Fecha del diagnóstico del tumor primario
- Edad al diagnóstico del tumor primario
- Fecha del diagnóstico de enfermedad metastásica
- Edad al diagnóstico de enfermedad metastásica
- Estado hormonal al diagnóstico inicial²
 - o Premenopáusica
 - o Perimenopáusica
 - o Postmenopáusica
- Edad al inicio de tratamiento con bevacizumab
- Estado hormonal al inicio del tratamiento con bevacizumab²
 - o Premenopáusica
 - o Perimenopáusica
 - o Postmenopáusica

Características del tumor

- Número de biopsia
- Localización del primario: mama, colon, recto
- Tipo histológico
 - o Carcinoma ductal infiltrante (CDI) de mama
 - o Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) de mama
 - o Otros tipos histológicos de cáncer de mama
 - o Adenocarcinoma colorrectal mucinoso
 - o Adenocarcinoma colorrectal no mucinoso.
- Grado histológico
 - o Gx: grado histológico desconocido
 - o Grado 1: bien diferenciado
 - o Grado 2: moderadamente diferenciado
 - o Grado 3: pobremente diferenciado
- RE²: positivos/negativos

- RProg²: positivos/negativos
- Ki67^{2,3} bajo (<12%)/alto (>12 %)
- HER2²: positivo/negativo
- Mutación de KRAS⁴: mutado/wild type
- Estadío tumoral (según TNM)⁵: I-IV
- Tamaño tumoral: T0-T4
- Afectación ganglionar: N0-N3
- Localización de afectación metastásica

Características del tratamiento recibido

- Fecha de cirugía
- Tipo de cirugía realizada: conservadora/radical/no realizada
- QT neoadyuvante⁶: si/no
- Esquema de QT neoadyuvante
- QT adyuvante⁷: si/no
- Esquema de QT adyuvante
- HT adyuvante^{2,7}: si/no
- Esquema de HT adyuvante²
- Radioterapia adyuvante⁷: si/no
- Esquema de la línea inmediatamente anterior al tratamiento con bevacizumab
- Tratamiento previo con antraciclinas²: si/no
- Tratamiento previo con taxanos²: si/no
- Duración de la línea anterior recibida
- Mejor respuesta obtenida a la línea anterior⁸
 - o Respuesta completa (RC)
 - o Respuesta parcial (RP)
 - o Enfermedad estable (EE)
 - o Progresión de enfermedad (PE)
 - o No valorable (NV)
- Línea de tratamiento en la que se administra bevacizumab: neoadyuvancia, adyuvancia, primera-quinta o sucesiva
- Fecha de inicio de tratamiento con bevacizumab
- Fecha de fin de tratamiento con bevacizumab
- Dosis de bevacizumab administrada: 5, 7.5, 10 ó 15 mg/kg
- Dosis de bevacizumab total⁹
- Frecuencia de administración de bevacizumab: quincenal/trisemanal
- Números de ciclos de bevacizumab recibidos
- Mejor respuesta obtenida con el tratamiento con bevacizumab⁸
 - o RC
 - o RP
 - o EE
 - o PE
 - o NV
- Fracaso al tratamiento con bevacizumab: si/no
- Motivo de la suspensión del tratamiento con bevacizumab
 - o Progresión
 - o Toxicidad (tipo de toxicidad)
 - o Intervención quirúrgica
 - o Complicaciones clínicas (deterioro clínico, progresión clínica, infección grave)
 - o Rechazo del paciente
 - o Finalización del tratamiento/respuesta mantenida
 - o No se suspende

- Mantenimiento de bevacizumab a la progresión: si/no
- Desarrollo de HTA con bevacizumab: si/no/no recogido
- Realización de rescate quirúrgico: sí/no
- Fecha de rescate quirúrgico

Fin del seguimiento

- Fecha de la última visita¹⁰
- Fecha de exitus
- Causa del exitus: progresión/toxicidad/desconocido

Muestras extraídas y polimorfismos analizados

- Muestra de ADN: extraída/no extraída
- Polimorfismo: realizado/ no realizado
- VEGF -2578 C/A (rs699947)
- VEGF -1498 C/T (rs833061)
- VEGFR-1 o FLT (rs9582036)
- ECA I/D (rs1799752 o rs4646994)
- AGTR1 A1166C (rs5186)
- AGT M235T (rs699)
- ADRB1 Gly389Arg (rs1801253)
- ADRB2 Arg16Gly (rs1042713)
- ADRB2 Gln27Glu (rs1042714)
- ADRB3 Trp64Arg (rs4994)
- GNB3 825 C>T (rs5443)
- NOS3 -786T>C (rs2070744)
- NOS3 Glu298Asp (rs1799983)
- Niveles de VEGF-A en sangre (ng/mL)
- Niveles de ECA en sangre (ng/mL)
 - o < 135 ng/mL
 - o ≥135 ng/mL

Tabla 6. Variables recogidas de los pacientes.

1. Recogidas sólo las iniciales. 2. Refiriéndose al grupo de pacientes con cáncer de mama. 3. Ki67: índice de proliferación celular. 4. Refiriéndose al grupo de pacientes con cáncer colorrectal. 5. Según clasificación TNM según la clasificación empleada en el momento de la recogida de datos: 7ª edición de la AJCC (American Joint Committee on Cancer) 2010 (ver anexo 5 y 6 para cáncer colorrectal y mama respectivamente). 6. Tratamiento neoadyuvante es el que se administra de forma previa a la cirugía. 7. Tratamiento adyuvante es el que se administra de forma complementaria a la cirugía. 8. Según los criterios RECIST 1.1 (ver anexo 4). 9. Suma de las dosis recibidas en cada ciclo; muestra la cantidad de bevacizumab que ha recibido el paciente a lo largo de todo el tratamiento. 10. Se ha recogido la última vez en que el paciente fue valorado en el Servicio de Oncología Médica (consulta o ingreso) o bien, la última consulta en otro Servicio de la que ha quedado constancia.

EE: enfermedad estable; HT: hormonoterapia; HTA: hipertensión arterial; PE: progresión de la enfermedad; QT: quimioterapia; RC: respuesta completa; RE: receptores de estrógenos; RP: respuesta parcial; RProg: receptores de progesterona.

4.3.2 Experimentación preclínica

4.3.2.1 Sobreexpresión del gen AGTR1 en células MCF-7

Las células de cáncer de mama MCF7 (homonodependientes) se obtuvieron de la colección europea de cultivos celulares (The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)) a través de Sigma-Aldrich (Madrid, España), y se cultivaron en medio mínimo esencial (*Minimum Essential Medium* MEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con 15% de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y antibióticos. Para generar células que sobreexpresaran AGTR-1, las células MCF7 fueron transfectadas con plásmidos pCR3.1 (control) y pCR3.1 hATR1, proporcionado por el Dr. Terry S. Elton. En resumen, la transfección con plásmidos que albergan el cassette KanR/NEO se realizó mediante el método de lipofección usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante y, las células resistentes a neomicina se seleccionaron mediante la adición al medio de 500 µg/mL de G418 (Life Technologies). El cultivo se lavó cada 2 ó 3 días hasta que las colonias aparecieron, y posteriormente, las células se transfirieron a otro matraz para amplificar la población de células resistentes. La sobreexpresión en clones se confirmó por Western blot usando una dilución 1:500 del anticuerpo anti-AGTR1 (sc-1173, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU).

4.3.2.2 Modelo de xenoinjerto murino

Para los xenoinjertos ortotópicos de cáncer de mama, a ratones hembra de 6 semanas de edad inmunocomprometidos (cepa NOD.SCID) se les implantaron pellets de 17 β -estradiol en el lateral del cuello. Tras 48 horas, las células MCF7 presentaron un crecimiento exponencial (los clones que sobreexpresaron AGTR-1 y los que no), se tripsinizaron, individualizaron y resuspendieron en BD Matrigel TM a una concentración final de 2 X 10⁷ células/mL, y 10⁶ células se inyectaron (aguja 25G) en la almohadilla grasa mamaria de la cuarta mama para generar tumores. Cuatro días después de la inoculación de las células, a los animales se les inyectó cada 3-4 días de forma intraperitoneal 10 mg/kg de bevacizumab o vehículo (solución salina fisiológica) como control. Al final del experimento, los ratones fueron sacrificados, los tumores fueron extirpados y sus volúmenes se estimaron midiendo a lo largo sus tres ejes, usando la fórmula $\pi/6$ (alto x ancho x largo).

4.3.2.3 Modelo transgénico murino MMTV-PyMT

En colaboración con el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), se emplearon ratones genéticamente modificados mediante la inserción del oncogén PyMT bajo el control del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) lo cual resulta en la aparición espontánea de tumores de la glándula mamaria y en el desarrollo de metástasis (ratones *MMTV-PyMT*)²²². Se cruzaron ratones hembra wild type (necesarios para la lactancia de la cría) con ratones macho heterocigotos. Posteriormente se realizó el genotipado mediante PCR para confirmar la presencia de PyMT.

Tras varias semanas de acondicionamiento en el animalario, comenzó el desarrollo del tumor primario, no siendo palpable hasta la semana 7. A partir de ahí, se iniciaron las mediciones del mismo. Al momento en el que el tumor alcanzó los 600mm³ aproximadamente (octava-novena semana de vida del ratón), se le consideró tiempo 0 [t0]). Los ratones se dividieron en 4 grupos en función del tratamiento recibido y fueron seguidos hasta su sacrificio (cuando el tumor alcanzó los 1500 mm³ aproximadamente) (ver figura 5).

- Grupo 1: recibieron vehículo (salino)
- Grupo 2: recibieron un anti-VEGF murino (B20)
- Grupo 3: recibieron AT-II
- Grupo 4: recibieron B20 y AT-II.

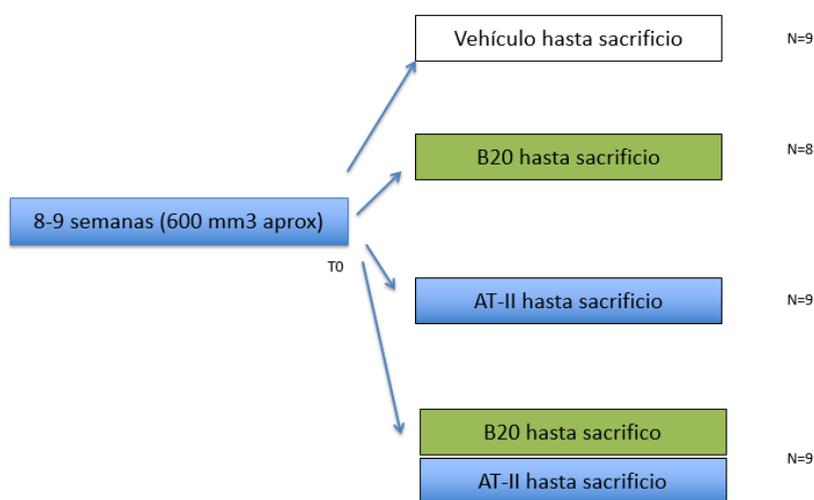


Figura 5: esquema de grupos de tratamiento.

El tratamiento fue administrado mediante mini bombas osmóticas (Micro-osmotic pump Model 1004 Alzet) que fueron colocadas mediante una incisión de 0.5 cm en el lomo del ratón de forma subcutánea, previa anestesia con isoflurano inhalado, rasurado y limpieza de la zona con etanol. Posteriormente se cerró la incisión mediante grapa y se administraron 200 μ L de hidrocloreto de buprenorfina al día durante los 3 días siguientes para control del dolor. Las bombas se prepararon con la medicación el día previo a su colocación y se dejaron a temperatura ambiente para hidratación de la misma. La dosis de AT-II administrada fue de 18 μ g/día. La capacidad de liberación de AT-II por parte de la mini bomba osmótica fue de 0.11 μ l/h durante 28 días (por lo que las mini bombas se recambiaron cada 28 días). B20 se administró a dosis de 5 mg/kg disuelto en buffer fosfato salino (PBS: *phosphate buffered saline*) 2 veces por semana. Se analizó la curva de crecimiento tumoral, así como la supervivencia de los ratones.



Figura 6: *mini-pump colocada en el ratón.*

5. RESULTADOS

5.1 Características de los pacientes

En el presente estudio se incluyeron un total de 232 pacientes, 98 de ellos (42.2%) con cáncer de colon, 51 (22%) con cáncer de recto y 83 (35.8%) con cáncer de mama. La mediana de edad al diagnóstico del tumor primario fue de 57 años (rango 24-83 años), de 59 años al diagnóstico de enfermedad metastásica (rango 27-83) y de 60 años al inicio de tratamiento con bevacizumab (rango 30-83). En cuanto a la comorbilidad, 79 de ellos (34.1%) no presentaba ninguna patología previa, 18 (7.7%) estaban diagnosticados de diabetes mellitus, 90 (38.8%) de HTA y en su mayoría (213, 91.8%) no padecían síndrome metabólico. Centrándonos en el manejo de dicha HTA, en 14 de los 90 pacientes (15.5%) se hacía sin tratamiento médico, en 53 (58.9%) se controlaba con 1 fármaco, en 15 (16.7 %) con dos fármacos, en 7 (7.8%) con 3 fármacos y sólo en 1 caso (1.1%) precisaba 4 fármacos antihipertensivos. En el caso de las pacientes con cáncer de mama, al diagnóstico inicial, 41 (49.4%) fueron premenopáusicas, 38 (45.8%) postmenopáusicas y 4 (4.8%) perimenopáusicas, mientras que al inicio del tratamiento con bevacizumab, la mayoría 60 (72.3%) fueron postmenopáusicas.

Con respecto a las características del tumor, el tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante en las pacientes con cáncer de mama (73, 88%) y no mucinoso en los pacientes con cáncer colorrectal (129, 86.6%), siendo moderadamente diferenciado en su mayoría, considerando ambas localizaciones de tumor primario (146, 62.9%). Atendiendo al perfil inmunohistoquímico de los tumores de mama, principalmente fueron luminales con expresión de RE en 61 casos (73.5%), de RProg en 56 (67.5%), con un Ki 67 elevado en la mitad de los casos aproximadamente (46, 55.4%) y con sobreexpresión de HER2 en 13 casos (15.7%). En cuanto a la determinación del estado mutacional de KRAS en cáncer colorrectal, cabe destacar que fue mutado en 76 casos (51%). Valorando la población en su conjunto, en 120 (52%) la enfermedad al diagnóstico se presentó en un estadio avanzado.

En relación al tratamiento recibido, se realizó una cirugía conservadora en 68 pacientes (29.3%) y radical en 122 (52.6%). Recibieron tratamiento adyuvante con QT neoadyuvante 35 pacientes (15%), con QT adyuvante 83 pacientes (35.8%), con radioterapia adyuvante 72 pacientes (31%) y en el caso de las pacientes con cáncer de

mama, recibieron HT adyuvante 42 de ellas (50.6%). A lo largo de la evolución de la enfermedad, se realizó un rescate quirúrgico en 65 pacientes (28%).

Considerando el tratamiento antiangiogénico, la TRG (RC+RP+EE) a la línea previa fue de 60.5%, habiendo recibido en el caso de las pacientes con cáncer de mama antraciclinas y taxanos previamente en la mayoría de los casos (84.3 y 76% respectivamente). Bevacizumab se administró principalmente en primera y en segunda línea (132 (56.9%) y 42 (18.1%) pacientes respectivamente), obteniéndose como mejor respuesta RC en 20 pacientes (8.6%), RP en 106 pacientes (45.7%) y EE en 74 (31.9%), pudiéndose rescatar quirúrgicamente 34 pacientes (14.7%). La mediana de ciclos recibidos fue de 12 ciclos (rango 1-63) con una mediana de duración de tratamiento de 34 semanas. El tratamiento se suspendió en 132 casos (56.9%) por progresión de la enfermedad, por toxicidad en 39 casos (16.8%) en forma de: tromboembolismo venoso en 10 pacientes (25.6%), sangrado en 9 pacientes (23%), fístulas en 6 pacientes (15.4%), tromboembolismo arterial en 7 pacientes (17.9%) [2 accidentes cerebrovasculares agudos isquémicos y 5 accidentes isquémicos transitorios], complicación de la cicatrización en 1 paciente (2.6%), HTA mal controlada en 1 paciente (2.6%), proteinuria en 1 paciente (2.6%) y bradicardia en 1 paciente (2.6%). En 2 casos se suspendió el antiangiogénico por toxicidad a la QT acompañante (5.1%) y en otro no estaba documentado el tipo de toxicidad (2.6%). Otros motivos de interrupción de tratamiento fueron: intervención quirúrgica en 21 pacientes (9.1%), rechazo del paciente en 5 pacientes (2.2%), finalización del tratamiento (en casos de administrarse en adyuvancia) o respuesta mantenida en 16 pacientes (6.9%) o complicaciones clínicas en 9 pacientes (3.9%) [4 casos de infección grave, 2 casos de deterioro clínico sin evidencia radiológica de progresión, 2 casos de suboclusión intestinal y 1 caso sin especificar el tipo de deterioro]. Cabe destacar que 49 pacientes (21.1%) desarrollaron HTA durante el tratamiento con bevacizumab, la cual se manejó adecuadamente con tratamiento antihipertensivo, suspendiéndose sólo en el caso previamente mencionado.

En el momento del análisis, 10 pacientes (4.3%) continuaban con tratamiento.

	Frecuencia	Porcentaje
N	232	100%
Localización del tumor primario		
- Mama	83	35.8%
- Colon	98	42.2%
- Recto	51	22%
Sexo		
- Mujeres	134	57.8%
- Hombres	98	42.2%
Síndrome metabólico previo		
- Sí	19	8.2%
- No	213	91.8%
Estado hormonal al diagnóstico¹		
- Premenopáusica	41	49.4%
- Perimenopáusica	4	4.8%
- Postmenopáusica	38	45.8%
Estado hormonal al inicio de tratamiento con bevacizumab¹		
- Premenopáusica	11	13.3%
- Perimenopáusica	4	4.8%
- Postmenopáusica	60	72.3%
- Desconocido	8	9.6%
Patología previa		
- DM	18	7.7%
- HTA	90	38.8%
- Otras	45	19.4%
- No patología	79	34.1%
Tratamiento antihipertensivo previo a bevacizumab		
- control sin tratamiento farmacológico	14	15.5%
- 1 fármaco antiHTA	53	58.9%
- 2 fármacos antiHTA	15	16.7%
- 3 fármacos antiHTA	7	7.8%

-	4 fármacos antiHTA	1	1.1%
Tipo histológico			
-	CDI ¹	73	88%
-	CLI ¹	10	12%
-	Mucinoso ²	20	13.4%
-	No mucinoso ²	129	86.6%
Grado histológico			
-	G1 (bien diferenciado)	20	8.6%
-	G2 (moderadamente diferenciado)	146	62.9%
-	G3 (pobremente diferenciado)	57	24.6%
-	Gx (desconocido)	9	3.9%
RE¹			
-	Positivos	61	73.5%
-	Negativos	22	26.5%
RProg¹			
-	Positivos	56	67.5%
-	Negativos	25	30.1%
-	No valorable	2	2.4%
Valor de Ki67¹			
-	Alto (>12%)	46	55.4%
-	Bajo (<12%)	16	19.3%
-	Desconocido	21	25.3%
Sobreexpresión de HER2¹			
-	si	13	15.7%
-	no	70	84.3%
Estado mutacional de KRAS²			
-	mutado	76	51%
-	wild type	66	44.3%
-	no realizado	7	4.7%
Estadio al diagnóstico (TNM)			
-	estadio I	5	2.2%

-	estadio IIA	25	10.8%
-	estadio IIB	21	9.1%
-	estadio IIC	1	0.4%
-	estadio IIIA	19	8.2%
-	estadio IIIB	28	12.1%
-	estadio IIIC	12	5.2%
-	estadio IV	120	52%
Tipo de cirugía			
-	conservadora	68	29.3%
-	radical	122	52.6%
-	no cirugía	42	18.1%
QT neoadyuvante			
-	sí	35	15%
-	no	197	85%
QT adyuvante			
-	sí	83	35.8%
-	no	149	64.2%
Radioterapia adyuvante			
-	sí	72	31%
-	no	160	69%
HT adyuvante ¹			
-	sí	42	50.6%
-	no	41	49.4%
Antraciclinas previas a bevacizumab ¹			
-	sí	70	84.3%
-	no	11	13.3%
-	desconocido	2	2.4%
Taxanos previos a bevacizumab ¹			
-	sí	63	76%
-	no	10	12%
-	taxanos con bevacizumab	10	12%

Respuesta a línea anterior a bevacizumab		
- RC	2	2.2%
- RP	26	28.6%
- EE	27	29.7%
- PE	32	35.1%
- NV	4	4.4%
Línea de tratamiento con bevacizumab		
- neoadyuvancia/adyuvancia	9	3.9%
- primera	132	56.9%
- segunda	42	18.1%
- tercera	18	7.7%
- cuarta	16	6.9%
- quinta o sucesiva	15	6.5%
Máxima respuesta a bevacizumab		
- RC	20	8.6%
- RP	106	45.7%
- EE	74	31.9%
- PE	27	11.6%
- NV	5	2.2%
Motivo de suspensión de bevacizumab		
- progresión	132	56.9%
- toxicidad	39	16.8%
- intervención quirúrgica	21	9.1%
- complicaciones clínicas	9	3.9%
- rechazo del paciente	5	2.2%
- finalización del tratamiento/respuesta mantenida	16	6.9%
- no se suspende	10	4.3%
Mantenimiento de bevacizumab a la progresión		
- sí	82	35.3%
- no	124	53.4%

- no progresión	26	11.2%
HTA durante el tratamiento con bevacizumab		
- sí	49	21.1%
- no	177	76.3%
- desconocido	6	2.6%
Recate quirúrgico		
- sí	65	28%
- no	167	72%

Tabla 7. Características de la población.

1. Referido a pacientes con cáncer de mama; 2. Referido a pacientes con cáncer colorrectal.

CDI: carcinoma ductal infiltrante; CLI: carcinoma lobulillar infiltrante; DM: Diabetes mellitus; EE: enfermedad estable; HTA: Hipertensión arterial; HT: hormonoterapia; NV: no valorable; PE: progresión de enfermedad; QT: quimioterapia; RC: respuesta completa; RE: receptores de estrógenos; RP: respuesta parcial; RProg: receptores de progesterona.

Las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos relacionados con la HTA analizados se detallan en la tabla 8.

Al comparar las frecuencias alélicas de nuestra muestra con las de la población caucásica europea según la base de datos de dbSNP y Alfred, se vio que los polimorfismos VEGF -2578 C/A (rs699947), VEGF -1498 C/T (rs833061), VEGFR-1 o FLT (rs9582036), ECA I/D (rs1799752 o rs4646994) y ADRB3 Trp64Arg (rs4994) estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, los polimorfismos AGTR1 A1166C (rs5186), AGT M235T (rs699), ADRB1 Gly389Arg (rs1801253), ADRB2 Arg16Gly (rs1042713), ADRB2 Gln27Glu (rs1042714), GNB3 825 C>T (rs5443), NOS3 -786T>C (rs2070744) y NOS3 Glu298Asp (rs1799983) estaban en desequilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$).

	Genotipos	Frecuencia Observada	porcentaje	Control Población española/europea (Esperado)	Chi cuadrado ¹
Polimorfismos de VEGF y su receptor	VEGF-2578 C/A (rs699947)			A 0.48 C 0.52	2.005
	AA	50	21.6%	52 23%	
	AC	123	53%	113 50%	
	CC	53	22.8%	61 27%	
	ND	6	2.6%		
	VEGF -1498 C/T (rs833061)			T 0.53 C 0.47	0.672
	TT	57	24.6%	61 28%	
	TC	115	49.6%	109 50%	
	CC	46	19.8%	48 22%	
	ND	14	6%		
	VEGFR-1 o FLT (rs9582036)			A 0.69 C 0.31	2.16
	AA	109	47%	109 47.6%	
	CA	92	39.7%	98 42.8%	
	CC	26	11.2%	20 9.6%	
	ND	5	2.2%		
Polimorfismos del SRA	ECA I/D (rs1799752 o rs4646994)			IN 0.37 DEL 0.63	0.91
	IN/IN	34	14.7%	31 13.7%	
	IN/DEL	98	42.2%	105 46.6%	
	DEL/DEL	92	39.7%	88 39.7%	
	ND	8	3.4%		
	AGTR1 A1166C (rs5186)			A 0.69 C 0.31	*6.57
	AA	124	53.4%	106 47.6%	
	AC	84	36.2%	95 42.8%	
	CC	14	6%	21 9.6%	
	ND	10	4.3%		
	AGT M235T (rs699)			T 0.57 C 0.43	*6.16
	TT	90	38.8%	74 32.5%	
	CT	105	45.3%	111 49%	
	CC	32	13.8%	42 18.5%	
	ND	5	2.2%		

Polimorfismos de los receptores adrenérgicos	ADRB1 Gly389Arg (rs1801253)			G 0.32 C 0.68	*5.23
	GG	13	5.6%	22 10%	
	CG	110	47.4%	98 44%	
	CC	99	42.7%	102 46%	
	ND	10	4.3%		
	ADRB2 Arg16Gly (rs1042713)			A 0.36 G 0.64	*155.99
	AA	90	38.8%	29 13%	
	AG	51	22%	104 46%	
	GG	84	36.2%	92 41%	
	ND	7	3%		
	ADRB2 Gln27Glu (rs1042714)			G 0.43 C 0.57	*6.48
	GG	37	15.9%	42 18.5%	
	CG	98	42.2%	111 49%	
	CC	92	39.7%	74 32.5%	
	ND	5	2.2%		
	ADRB3 Trp64Arg (rs4994)			T 0.94 C 0.06	0
	TT	97	41.8%	97 88,4%	
	TC	12	5.2%	12 11,2%	
	CC	1	0.4%	1 0.4%	
	ND	122	52.6%		
Polimorfismos de genes relacionados con el manejo renal de sodio	GNB3 825 C>T (rs5443)			T 0.30 C 0.70	*5.01
	TT	30	12.9%	20 9%	
	TC	96	41.4%	95 42%	
	CC	100	43.1%	111 49%	
	ND	6	2.6%		
Polimorfismos del gen de la sintasa de óxido nítrico endotelial	NOS3 -786T>C (rs2070744)			C 0.50 T 0.50	*12.12
	CC	17	7.3%	30 25%	
	CT	59	25.4%	60 50%	
	TT	44	19%	30 25%	
	ND	112	48.3%		
	NOS3 Glu298Asp (rs1799983)			G 0.62 T 0.38	*5.29
	GG	38	16.4%	47 38.4%	
	GT	58	25%	57 47.1%	
	TT	26	11.2%	18 14.5%	
	ND	110	47.4%		

Niveles de VEGF-A en plasma (ng/ml) ²		3.94 +/- 2.52			
Niveles de ECA en plasma (ng/mL) ²		140.22 +/- 109.33			

Tabla 8. Frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos relacionados con la HTA analizados.
 1. Para considerar diferencias significativas ($p < 0.05$ con 1 Grado de Libertad) el valor de chi cuadrado ha de ser superior a 3.84. 2. resultado expresado como valor de la media +/- desviación típica. ND: no determinado.

5.2 Análisis temporal

En el momento del análisis habían fracasado al tratamiento 171 pacientes (73.7%), ya fuera por progresión (132, 77.2%) o por toxicidad (39, 22.8%).

La mediana de TFT con bevacizumab fue de 8.8 meses (IC 95% 6.11-11.48) en pacientes con cáncer de mama avanzado y de 10.16 meses (IC 95% 8.55-11.78) en pacientes con cáncer colorrectal avanzado (ver figuras 7 y 8).

En relación a la SG, considerando la fecha de última visita en los pacientes vivos, en las pacientes con cáncer de mama avanzado, con 57 eventos en el momento del análisis, la mediana fue de 32.20 meses (IC 95% 20.87-43.53). En pacientes con cáncer colorrectal avanzado, con 100 eventos en el momento del análisis, fue de 33.23 meses (IC 95% 25.17-41.29) (ver figuras 9 y 10).

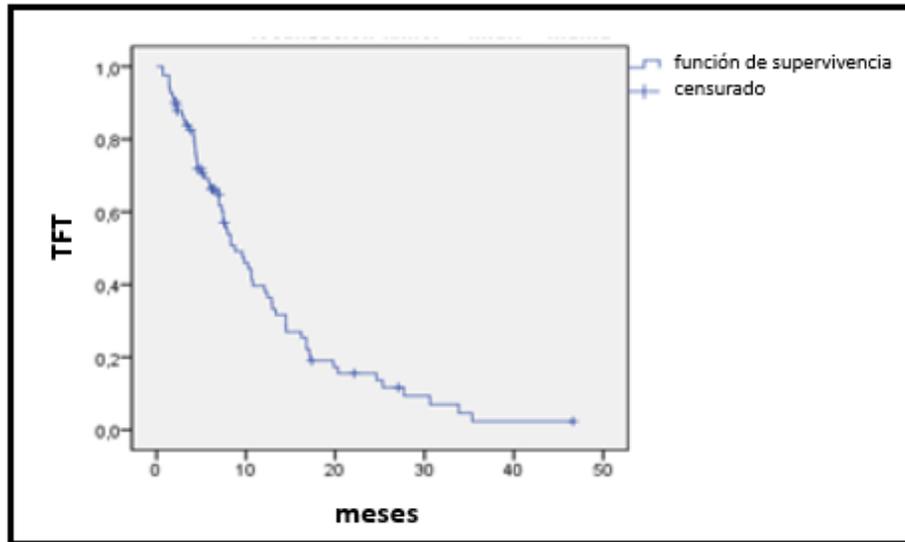


Figura 7. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) en pacientes con cáncer de mama avanzado.

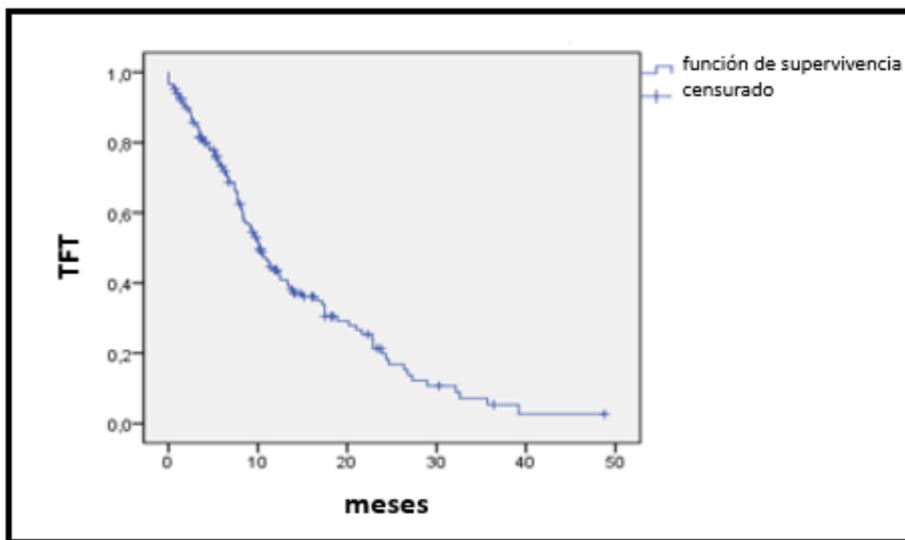


Figura 8. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) en pacientes con cáncer colorrectal avanzado.

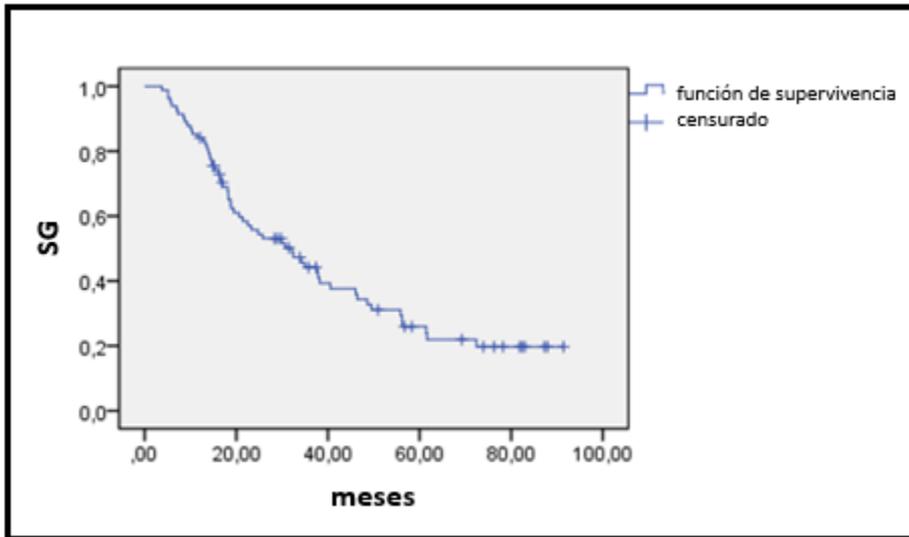


Figura 9. Supervivencia global (SG) en pacientes con cáncer de mama avanzado.

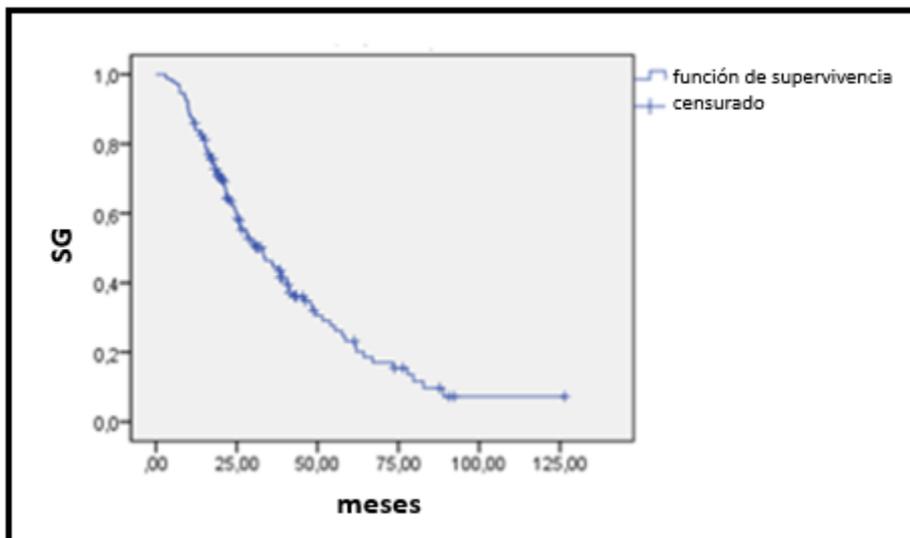


Figura 10. Supervivencia global (SG) en pacientes con cáncer colorrectal avanzado.

5.3 Estudio de los polimorfismos del SRA

5.3.1 Relación entre los diferentes polimorfismos y la respuesta al tratamiento antiangiogénico

Todos los polimorfismos se compararon con la TRG, el TFT y la SG.

Considerando nuestra muestra en su totalidad, pudimos ver que el genotipo AA vs CC y AC del polimorfismo VEGF -2578 C/A (rs699947) se asoció a una tasa de progresión mayor: 22.4 vs 11.5 y 7.5% respectivamente ($p=0.02$). Como cabía esperar, los del genotipo AA presentaron un TFT menor [mediana de TFT de 7.37 meses (IC 95% 5.88-8.85) en AA vs 10.60 meses (IC 95% 9.25-11.96) en AC y 12.90 meses (IC 95% 5.12-20.68) en CC; $p=0.004$] y una SG menor [mediana de SG de 24.57 meses (IC 95% 17.29-31.84) en AA vs 30.90 meses (IC 95% 22.91-38.89) en AC y 35.97 meses (IC 95% 24.71-47.23) en CC; $p=0.25$].

También se encontraron más progresiones en los pacientes con genotipo IN/IN vs IN/DEL y DEL/DEL del polimorfismo ECA I/D (rs1799752 o rs4646994): 23.5 vs 9.7% respectivamente ($p=0.04$). De forma coherente, en aquéllos con genotipo IN/IN se observó un TFT y una SG menores, pero sin diferencias estadísticamente significativas [mediana de TFT de 8.07 meses (IC 95% 2.46-13.67) en IN/IN vs 9.93 meses (IC 95% 8.56-11.31) en IN/DEL y DEL/DEL; $p=0.22$; mediana de SG de 28.10 meses (IC 95% 18.96-37.24) en IN/IN vs 33.23 meses (IC 95% 25.80-40.67) en IN/DEL y DEL/DEL; $p=0.56$].

Las diferencias encontradas con el polimorfismo AGTR1 A1166C (rs5186) no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, en consonancia, con nuestros resultados previos, constatamos más progresiones en los pacientes con el genotipo AA vs AC/CC del polimorfismo AGTR1 A1166C (rs5186): 13.9 vs 8.4% respectivamente ($p=0.21$), lo cual se correlacionó con un TFT menor [mediana de 9.80 meses (IC 95% 7.96-11.64) en AA vs 10.03 meses (IC 95% 7.25-12.82) en AC/CC; $p=0.27$] y una SG menor [mediana de 29.67 meses (IC 95% 22.74-36.59) en AA vs 33.23 meses (IC 95% 22.42-44.04) en AC/CC; $p=0.18$].

No encontramos diferencias en el resto de polimorfismos.

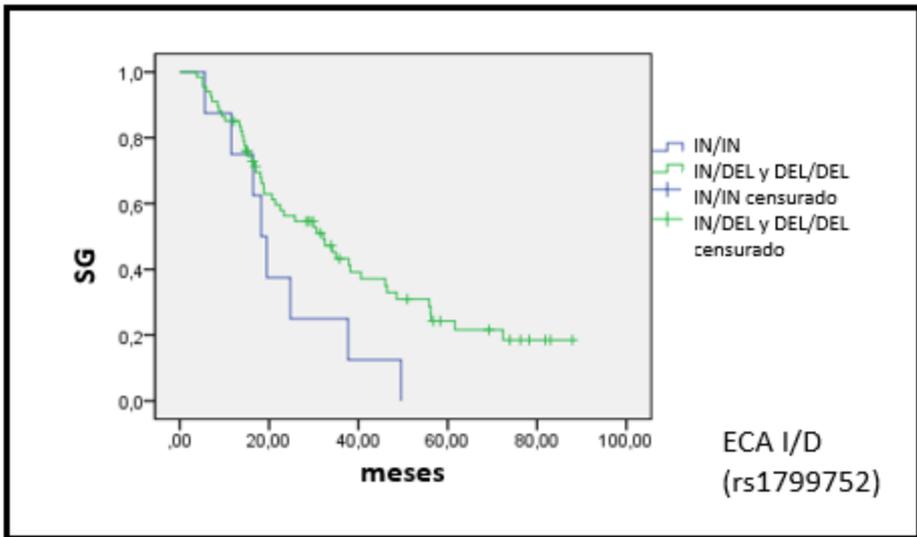
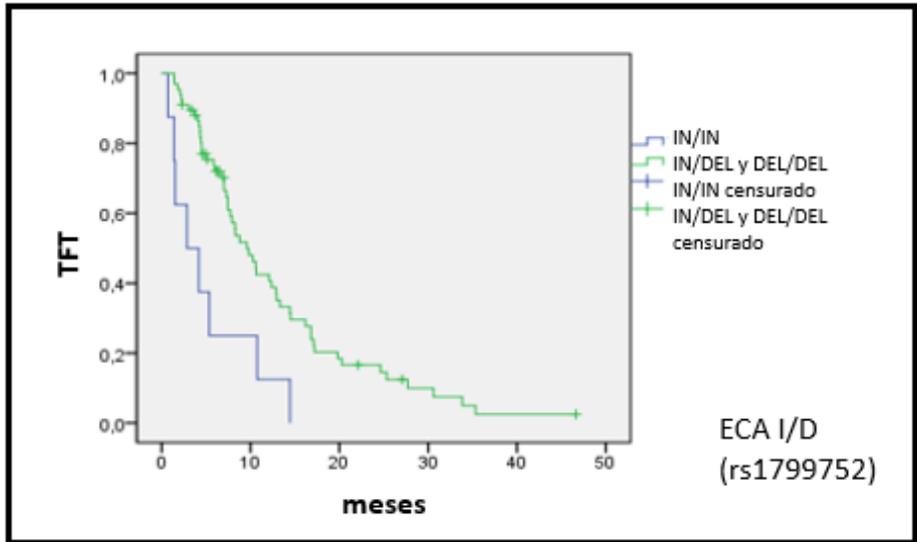
Analizamos los resultados en función de la localización del tumor primario (ver tablas 9 y 10).

En **cáncer de mama**, se observaron más progresiones en aquellas con genotipo IN/IN vs IN/DEL y DEL/DEL del polimorfismo ECA I/D (rs1799752 o rs4646994): 50 vs 11.8% respectivamente ($p=0.02$). De forma concordante, aquellas con el genotipo IN/IN fracasaron al tratamiento antes [mediana de TFT de 2.87 meses (IC 95% 0-6.56)] en comparación con las del genotipo IN/DEL y DEL/DEL [mediana de 9.60 meses (IC 95% 6.88-12.32); $p=0.003$]. Esta peor evolución de las pacientes con genotipo IN/IN también se reflejó en la supervivencia, constatando una mediana menor de SG en comparación con los otros genotipos pero sin alcanzar la significación estadística [mediana de 18.23 meses (IC 95% 14.03-22.44) en IN/IN vs 32.20 meses (IC 95% 20.97-43.43) en IN/DEL y DEL/DEL; $p=0.06$] (ver figuras 11 y 12).

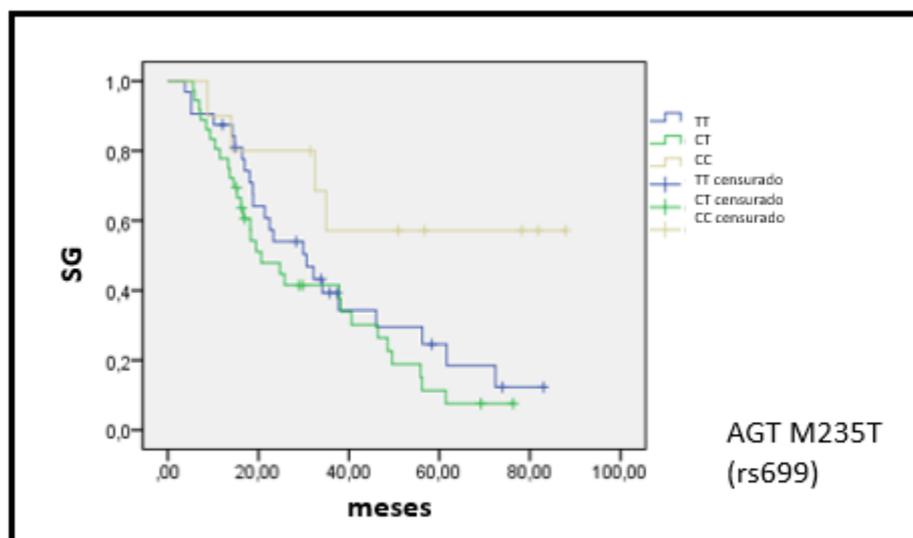
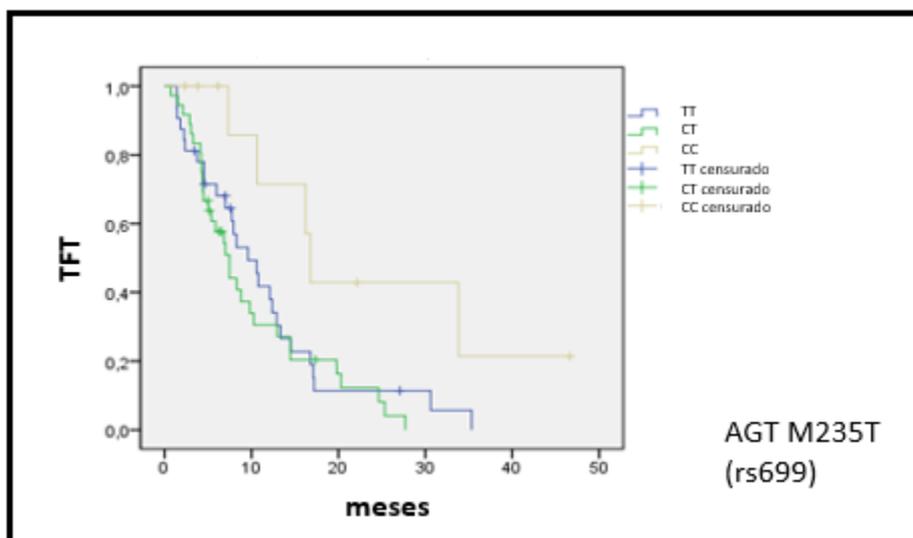
Además se identificaron diferencias con el polimorfismo AGT M235T (rs699), de tal manera que en aquellas con el genotipo CT se vieron más progresiones en comparación con TT y CC: 25 vs 9.1 y 0% respectivamente ($p=0.07$), así como una mediana de TFT menor [7.47 meses (IC 95% 5.45-9.48) en CT vs 9.60 meses (IC 95% 6.17-13.03) en TT y 16.80 meses (IC 95% 15.26-18.34) en CC; $p=0.03$] y de SG menor [20.63 meses (IC 95% 12.03-29.24) en CT vs 30.67 meses (IC 95% 18.35-42.99) en TT y no alcanzada en CC; $p=0.04$] (ver figuras 13 y 14).

Aunque no se hallaron diferencias entre los genotipos del polimorfismo VEGFR-1 o FLT (rs9582036) con la TRG ni el TFT, no fue así en SG, observando que las que tenían el genotipo CC vivían menos en comparación con el resto de grupos [mediana de SG de 13.67 meses (IC 95% 0.00-31.39) en CC vs 22.50 meses (IC 95% 7.05-37.95) en AA y 48.57 meses (IC 95% 43.63-53.50) en CA; $p=0.005$] (ver figura 15).

De forma similar, pudimos constatar que las pacientes con el genotipo CT de NOS3 786T>C (rs2070744) tuvieron una SG menor [mediana de 19.47 meses (IC 95% 15.14-23.79) en CT vs 48.57 meses (IC 95% 0-97.71) en TT sin alcanzar la mediana en CC; $p=0.034$] (ver figura 16).



Figuras 11 y 12. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) y supervivencia global (SG) en función del polimorfismo ECA I/D en cáncer de mama avanzado.



Figuras 13 y 14. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) y supervivencia global (SG) en función del polimorfismo AGT M235T (rs699) en cáncer de mama avanzado.

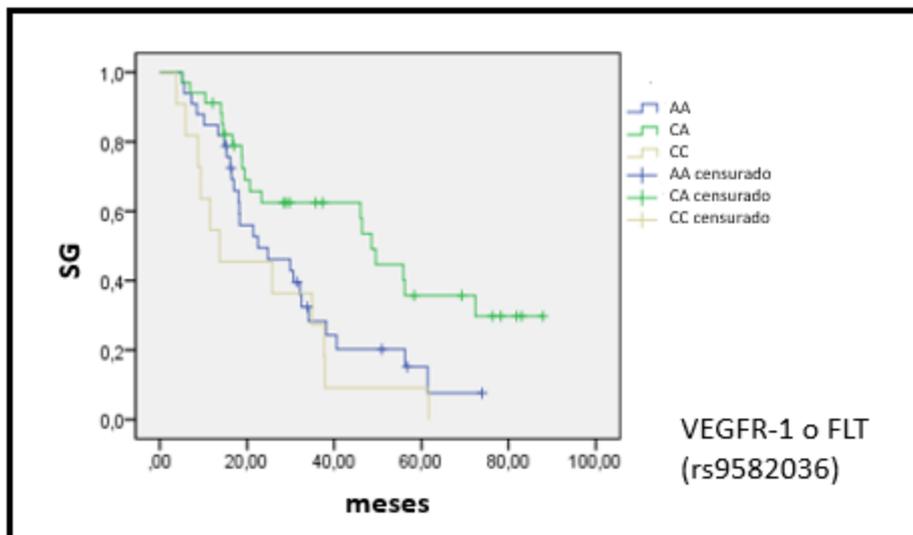


Figura 15. Supervivencia global (SG) en función del polimorfismo VEGFR-1 o FLT (rs9582036) en cáncer de mama avanzado.

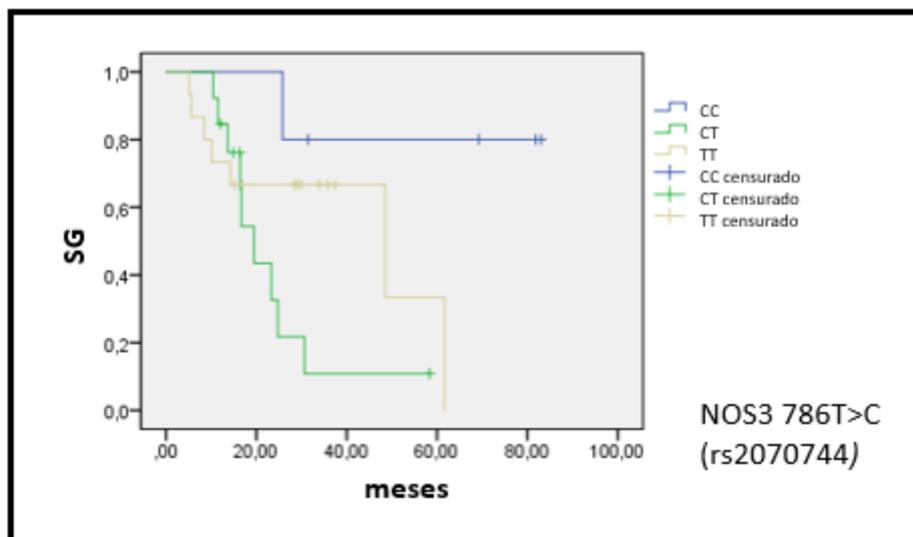


Figura 16. Supervivencia global (SG) en función del polimorfismo NOS3 786T>C (rs2070744) en cáncer de mama avanzado.

En **cáncer colorrectal**, se observaron más progresiones en aquéllos con el genotipo AA vs CC y AC del polimorfismo VEGF -2578 C/A (rs699947): 24.2 vs 8.8 y 3.9 % respectivamente ($p=0.006$). Análogamente, los del genotipo AA fracasaron antes al tratamiento [mediana de TFT de 8.30 meses (IC 95% 5.80-10.79) en AA vs 10.50 meses (IC 95% 8.35-12.65) en AC y 17.50 meses (IC 95% 9.34-25.66) en CC; $p=0.003$] y vivieron menos [mediana de SG de 23.20 meses (IC 95% 18.02-28.37) en AA vs 33.70 meses (IC 95% 23.99-43.40) en AC y 40.47 meses (IC 95% 26.59-54.34) en CC; $p=0.05$] (ver figuras 17 y 18).

Además, vimos una tasa de progresión mayor en los portadores del genotipo AA vs AC/CC del polimorfismo AGTR1 A1166C (rs5186): 13.7 vs 4.3% respectivamente que rozó la significación estadística ($p=0.05$), sin encontrar diferencias relevantes en TFT ni SG [mediana de TFT de 10.13 meses (IC 95% 7.79-12.47) en AA vs 11.03 meses (IC 95% 7.91-14.15) en AC/CC; $p=0.58$; mediana de SG de 29.67 meses (IC 95% 19.94-39.39) en AA vs 33.43 meses (IC 95% 19.68-47.19) en AC/CC; $p=0.69$].

El genotipo GT del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) también se asoció con más progresiones en comparación con los genotipos homocigóticos: 15.6 vs 0% ($p=0.05$). Aunque no se hallaron diferencias significativas en el TFT, sí se encontraron en SG, siendo menor en GT (mediana de SG de 25.97 meses (IC 95% 7.09-44.85) en GT vs 41.30 meses (28.49-54.10) en GG, sin ser alcanzada en TT; $p=0.01$) (ver figura 19).

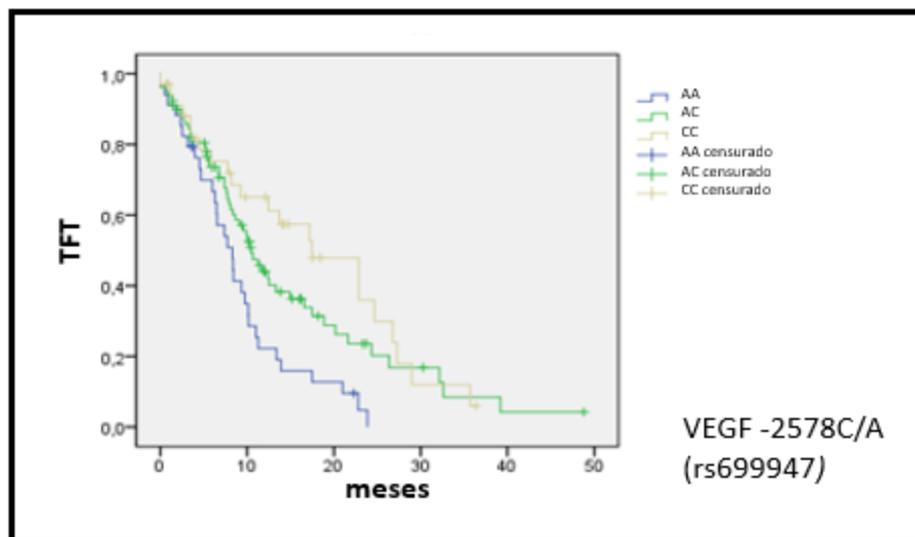


Figura 17. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) en función del polimorfismo VEGF -2578C/A (rs699947) en cáncer colorrectal avanzado.

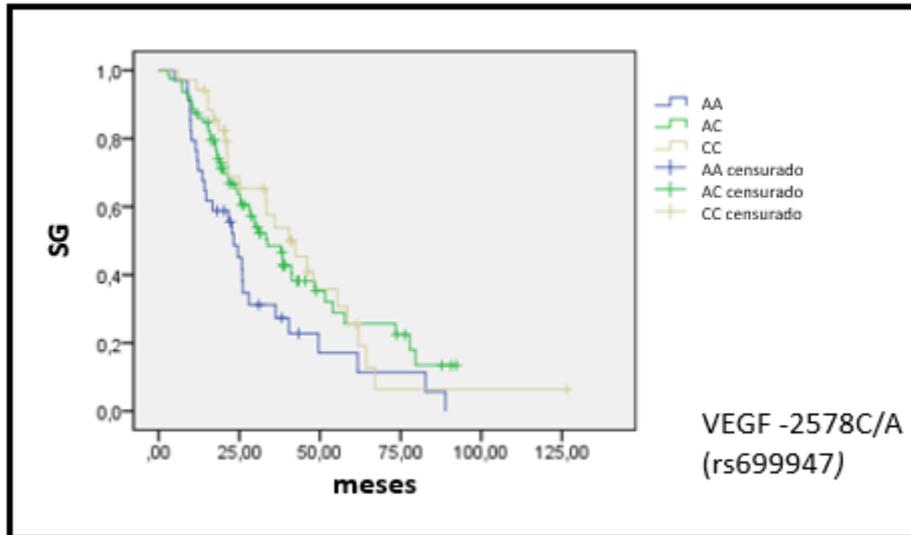


Figura 18. Supervivencia global (SG) en función del polimorfismo VEGF -2578C/A (rs699947) en cáncer colorrectal avanzado.

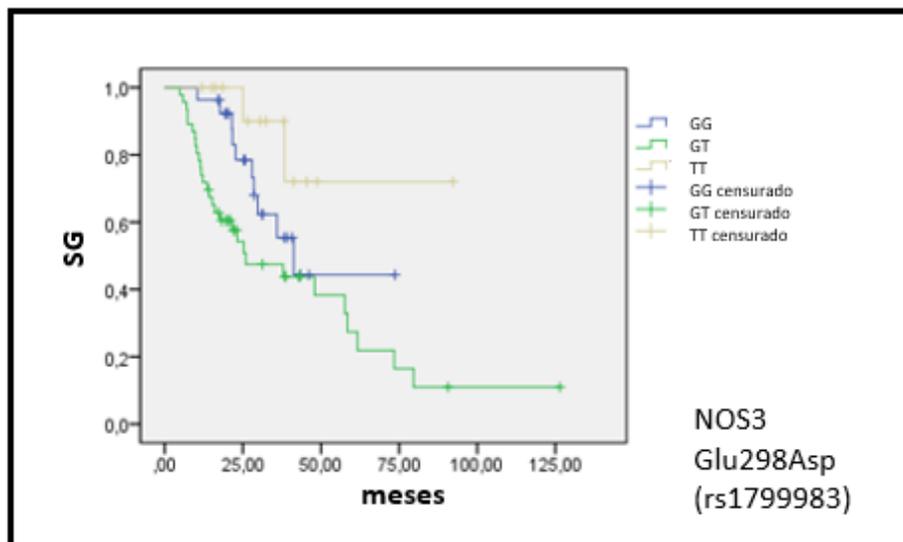


Figura 19. Supervivencia global (SG) en función del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) en cáncer colorrectal avanzado.

genotipo	n (%)	respuestas (RG vs PRO) %	mediana TFT (IC 95%; en meses)	mediana SG (IC 95%) en meses
VEGF -2578C/A (rs699947)				
AA	16 (20.5)	81.3 vs 18.8	6.83 (3.77-9.89)	37.87 (7.33-68.39)
AC	44 (56.4)	86.4 vs 13.6	10.60 (9.24-11.95)	29.87 (16.21-43.52)
CC	18 (23.1)	83.3 vs 16.7	7.73 (4.74-10.72)	32.20 (10.34-54.06)
		p=0.76	p=0.07	p=0.86
VEGF -1498 C/T (rs833061)				
TT	20 (26.3)	85 vs 15	7.73 (2.68-12.78)	32.50 (24.40-40.59)
TC	44 (57.9)	86.4 vs 13.6	10.63 (7.84-13.43)	23.30 (11.69-34.91)
CC	12 (15.8)	75 vs 25	6.83 (0.06-13.61)	18.77 (11.47-26.07)
		p=0.61	p=0.10	p=0.69
FLT VEGFR-1 o FLT (rs9582036)				
AA	34 (43)	82.4 vs 17.6	12.10 (7.79-16.40)	22.50 (7.05-37.95)
CA	34 (43)	85.3 vs 14.7	7.47 (5.45-9.48)	48.57 (43.63-53.50)
CC	11 (14)	90.9 vs 9.1	8.30 (3.39-13-20)	13.67 (0.00-31.39)
		p=0.78	p=0.83	*p=0.005
ECA I/D (rs1799752 o rs4646994)				
IN/IN	8 (10.6)	50 vs 50	2.87 (0.00-6.56)	18.23 (14.03-22.44)
IN/DEL	34 (44.7)	88.2 vs 11.8	12.37 (6.99-17.74)	32.50 (22.54-42.46)
DEL/DEL	34 (44.7)	88.2 vs 11.8	7.73 (4.79-10.67)	23.30 (9.94-36.66)
		*p=0.02	*p=0.002	p= 0.16
AGTR1 A1166C (rs5186)				
AA	49 (65.3)	85.7 vs 14.3	8.80 (6.34-11.26)	22.50 (7.13-37.87)
AC	21 (28)	81 vs 19	6.83 (3.13-10.53)	25.77 (16.29-35.24)
CC	5 (6.7)	80 vs 20	NA	NA
		p=0.68	p=0.65	p=0.15
AGT M235T (rs699)				
TT	33 (41.8)	90.9 vs 9.1	9.60 (6.17-13.03)	30.67 (18.35-42.99)
CT	36 (45.6)	75 vs 25	7.47 (5.45-9.48)	20.63 (12.03-29.24)
CC	10 (12.6)	100 vs 0	16.80 (15.26-18.34)	NA
		p=0.07	*p=0.03	*p=0.04
ADRB1 Gly389Arg (rs1801253)				
GG	4 (5.2)	75 vs 25	10.27 (0.00-22.94)	15.30 (4.23-26.37)
CG	41 (53.2)	85.4 vs 14.6	7.73 (6.39-9.07)	23.30 (10.99-35.61)
CC	32 (41.6)	84.4 vs 15.6	10.60 (7.59-13.60)	37.87 (13.61-62.12)
		p=0.77	p=0.79	p=0.42
ADRB2 Arg16Gly (rs1042713)				
AA	33 (42.3)	81.8 vs 18.2	9.80 (5.89-13.71)	25.77 (9.72-41.81)
AG	16 (20.5)	93.8 vs 6.3	8.30 (1.68-14.92)	21.43 (0.00-54.28)
GG	29 (37.2)	82.8 vs 17.2	8.80 (5.86-11.74)	30.67 (17.13-44.20)
		p= 0.61	p=0.94	p=0.87
ADRB2 Gln27Glu (rs1042714)				
GG	14 (17.7)	85.7 vs 14.3	8.80 (6.69-10.90)	37.70 (19.48-55.92)
CG	29 (36.7)	82.8 vs 17.2	7.30 (6.02-8.58)	23.30 (0.38-46.22)
CC	36 (45.6)	86.1 vs 13.9	10.63 (4.85-16.41)	24.73 (14.89-34.57)
		p=0.92	p=0.50	p=0.88
ADRB3 Trp64Arg (rs4994)				
TT	38 (82.6)	13.2 vs 86.8	10.77 (7.04-14.49)	32.20 (13.42-50.98)
TC	8 (17.4)	0 vs 100	10.27 (7.08-13.45)	16.97 (13.13-20.80)
CC	0(0)	0 vs 0
		p=0.57	p=0.60	p=0.45
GNB3 825 C>T (rs5443)				
TT	9 (11.4)	66.7 vs 33.3	8.30 (0.84-15.76)	19.47 (16.19-22.74)
TC	32 (40.5)	81.3 vs 18.8	7.73 (5.54-9.92)	21.43 (6.82-36.05)
CC	38 (48.1)	92.1 vs 7.9	9.80 (6.47-13.13)	37.70 (10.05-65.35)
		p=0.09	p= 0.46	p=0.26
NOS3 786T>C (rs2070744)				
CC	5 (14.7)	100 vs 0	7.47 (0.01-14.93)	NA
CT	14 (41.2)	78.6 vs 21.4	5.87 (2.17-9.56)	19.47 (15.14-23.79)
TT	15 (44.1)	73.3 vs 26.7	7.00 (4.03-9.97)	48.57 (00.00-97.71)
		p=0.63	p=0.75	*p=0.034
NOS3 Glu298Asp (rs1799983)				
GG	11 (31.4)	72.7 vs 27.3	4.53 (1.15-7.91)	23.30 (2.41-44.18)
GT	12 (34.3)	75 vs 25	7.00 (5.07-8.93)	48.57 (16.27-80.86)
TT	12 (34.3)	91.7 vs 8.3	7.47 (0.00-19.69)	NA
		p=0.58	p=0.65	p=0.34

Tabla 9. Relación entre los polimorfismos y la tasa de respuestas globales (TRG), tiempo al fallo de tratamiento (TFT) y supervivencia global (SG) en pacientes con cáncer de mama avanzado. RG: respuestas globales; PRO: progresión.

genotipo	n (%)	respuestas (RG vs PRO) %	mediana TFT (IC 95%) en meses	mediana SG (IC 95%) en meses
VEGF -2578C/A (rs699947)				
AA	34 (23)	75.8 vs 24.2	8.30 (5.80-10.79)	23.20 (18.02-28.37)
AC	79 (53.4)	96.1 vs 3.9	10.50 (8.35-12.65)	33.70 (23.99-43.40)
CC	35 (23.6)	91.2 vs 8.8	17.50 (9.34-25.66)	40.47 (26.59-54.34)
		*p=0.006	*p=0.003	p=0.05
VEGF -1498 C/T (rs833061)				
TT	37 (26.1)	86.1 vs 13.9	17.20 (6.66-27.74)	40.37 (28.06-52.67)
TC	71 (50)	94.1 vs 5.9	9.93 (7.74-12.12)	33.70 (22.64-44.76)
CC	34 (23.9)	84.8 vs 15.2	9.33 (6.92-11.74)	25.83 (20.61-31.06)
		p=0.23	p=0.19	p=0.26
FLT VEGFR-1 o FLT (rs9582036)				
AA	75 (50.7)	90.4 vs 9.6	11.03 (7.43-14.63)	28.10 (18.25-37.95)
CA	58 (39.2)	90.9 vs 9.1	9.10 (6.52-11.68)	30.90 (18.57-43.23)
CC	15 (10.1)	86.7 vs 13.3	13.40 (7.66-19.14)	41.17 (30.29-52.03)
		p=0.88	p=0.27	p=0.64
ECA I/D (rs1799752 o rs4646994)				
IN/IN	26 (17.6)	84.6 vs 15.4	11.67 (0.82-22.51)	28.50 (20.75-36.25)
IN/DEL	64 (43.2)	90 vs 10	11.27 (8.75-13.78)	35.97 (23.16-48.77)
DEL/DEL	58 (39.2)	93 vs 7	8.40 (6.73-10.07)	29.80 (19.59-40.01)
		p=0.49	p=0.82	p=0.81
AGTR1 A1166C (rs5186)				
AA	75 (51)	86.3 vs 13.7	10.13 (7.79-12.47)	29.67 (19.94-39.39)
AC	63 (42.9)	100 vs 0	11.67 (8.99-14.34)	33.43 (24.15-42.71)
CC	9 (6.1)	62.5 vs 37.5	7.63 (0.00-16.42)	22.70 (0.90-44.49)
		*p=0.0001	p=0.12	p=0.45
AGT M235T (rs699)				
TT	57 (38.5)	89.3 vs 10.7	11.27 (8.70-13.83)	30.90 (14.73-47.07)
CT	69 (46.6)	93.9 vs 6.1	9.57 (7.55-11.58)	33.70 (25.01-42.39)
CC	22 (14.9)	81 vs 19	10.03 (4.94-15.12)	25.97 (20.39-31.53)
		p=0.21	p=0.53	p=0.89
ADRB1 Gly389Arg (rs1801253)				
GG	9 (6.2)	100 vs 0	28.97 (7.99-49.93)	51.63 (45.46-57.80)
CG	69 (47.6)	84.8 vs 15.2	10.30 (5.87-14.73)	25.33 (17.79-32.87)
CC	67 (46.2)	93.8 vs 6.2	9.33 (7.44-11.22)	33.23 (20.26-46.20)
		p=0.13	p=0.19	p=0.68
ADRB2 Arg16Gly (rs1042713)				
AA	57 (38.8)	89.1 vs 10.9	11.27 (9.13-13.39)	33.43 (18.88-47.99)
AG	35 (23.8)	91.2 vs 8.8	9.33 (7.86-10.80)	33.23 (12.21-54.25)
GG	55 (37.4)	90.6 vs 9.4	11.27 (4.92-17.61)	30.90 (19.11-42.69)
		p=0.94	p=0.29	p=0.59
ADRB2 Gln27Glu (rs1042714)				
GG	23 (15.5)	90.9 vs 9.1	8.07 (3.48-12.65)	47.93 (21.92-73.95)
CG	69 (46.6)	89.4 vs 10.6	9.73 (7.47-12.00)	30.90 (22.01-39.79)
CC	56 (37.8)	90.9 vs 9.1	10.50 (8.19-12.81)	28.50 (16.19-40.81)
		p=0.95	p=0.48	p=0.62
ADRB3 Trp64Arg (rs4994)				
TT	59 (92.2)	87.7 vs 12.3	11.03 (7.96-14.11)	25.27 (18.42-32.11)
TC	4 (6.3)	100 vs 0	10.13 (3.93-16.34)	33.43 (11.35-55.52)
CC	1 (1.6)	100 vs 0	32.60	53.97
		p=1.00	p=0.51	p=0.84
GNB3 825 C>T (rs5443)				
TT	21 (14.3)	95 vs 5	17.20 (1.76-32.64)	36.20 (26.02-46.38)
TC	64 (43.5)	83.9 vs 16.1	8.33 (5.66-11.01)	28.10 (19.26-36.93)
CC	62 (42.2)	95 vs 5	11.67 (8.81-14.53)	33.23 (21.81-44.66)
		p=0.09	p=0.07	p=0.86
NOS3 786T>C (rs2070744)				
CC	12 (14)	100 vs 0	21.63	27.97 (11.65-44.77)
CT	45 (52.3)	88.4 vs 11.6	8.37 (6.05-10.68)	58.50 (35.31-81.69)
TT	29 (33.7)	96.6 vs 3.4	11.67 (0.00-26.18)	47.93 (28.40-67.46)
		p=0.40	p=0.22	p=0.05
NOS3 Glu298Asp (rs1799983)				
GG	27 (31)	100 vs 0	11.67 (3.59-19.74)	41.30 (28.49-54.10)
GT	46 (52.9)	84.4 vs 15.6	7.70 (6.21-9.19)	25.97 (7.09-44.85)
TT	14 (16.1)	100 vs 0	12.43 (4.56-20.30)	NA
		p=0.05	p=0.11	*p=0.011

Tabla 10. Relación entre los polimorfismos y la tasa de respuestas globales (TRG), tiempo al fallo de tratamiento (TFT) y supervivencia global (SG) en pacientes con cáncer colorrectal avanzado. RG: respuestas globales; PRO: progresión.

5.3.2 Relación entre los diferentes polimorfismos y los niveles plasmáticos de VEGF-A y ECA

Los niveles plasmáticos de VEGF-A se determinaron en 52 pacientes (62.6%) con cáncer de mama y 82 pacientes (55%) con cáncer colorrectal. En cuanto a los niveles de ECA en plasma, fueron analizados en 50 pacientes (60.2%) con cáncer de mama y 66 pacientes (44.3%) con cáncer colorrectal.

Con respecto a VEGF-A, en cáncer colorrectal, se observó que los genotipos AC del polimorfismo VEGF -2578 C/A (rs699947) y TC del polimorfismo VEGF -1498 C/T (rs833061) se asociaron con niveles menores de VEGF-A en plasma ($p=0.03$).

No se encontraron diferencias en las pacientes con cáncer de mama ni al considerar la muestra en su totalidad.

Tampoco se vieron diferencias entre los polimorfismos y los valores de ECA independientemente de la localización del tumor primario (ver tablas 11 y 12). Sin embargo, considerando todos los pacientes, pudimos evidenciar que el genotipo DEL/DEL se asoció con niveles circulantes de ECA más elevados en comparación con el resto de genotipos pero sin alcanzar la significación estadística. De tal manera que la media de los niveles de ECA fue de **168.81** +/- 136.41 ng/mL en DEL/DEL ($n=39$), **133.02** +/- 98.26 ng/mL en IN/DEL ($n=62$) y **95.88** +/- 32.43 ng/mL en IN/IN ($n=14$); $p=0.11$. Este hallazgo se mantuvo al analizar por separado los pacientes con cáncer de mama y colorrectal, sin llegar en ningún caso a ser estadísticamente significativo.

genotipo	n	niveles de VEGF		p	niveles de ECA		p
		media			<135 n (%)	≥ 135 n (%)	
VEGF -2578C/A (rs699947)				0.52			0.60
AA	10	4.80			4 (50)	4 (50)	
AC	29	4.79			18 (60)	12 (40)	
CC	12	3.65			8 (72.7)	3 (27.3)	
VEGF -1498 C/T (rs833061)				0.15			0.16
TT	13	3.28			9 (81.8)	2 (18.2)	
TC	31	4.91			19 (59.4)	13 (40.6)	
CC	7	5.11			2 (33.3)	4 (66.7)	
FLT VEGFR-1 o FLT (rs9582036)				0.26			0.53
AA	23	4.89			14 (60.9)	9 (39.1)	
CA	20	3.74			10 (55.6)	8 (44.4)	
CC	9	5.13			7(77.8)	2 (22.2)	
ECA I/D (rs1799752 o rs4646994)				0.09			0.72
IN/IN	3	2.69			2 (66.7)	1 (33.3)	
IN/DEL	27	5.46			18 (66.7)	9 (33.3)	
DEL/DEL	20	3.63			10 (52.6)	9 (47.4)	
AGTR1 A1166C (rs5186)				0.69			0.66
AA	32	4.54			18 (58.1)	13 (41.9)	
AC	14	3.96			7 (53.8)	6 (46.2)	
CC	2	6.79			2 (100)	0 (0)	
AGT M235T (rs699)				0.26			0.93
TT	22	4.32			13 (65)	7 (35)	
CT	22	4.25			13 (59.1)	9 (40.9)	
CC	8	5.61			5 (62.5)	3 (37.5)	
ADRB1 Gly389Arg (rs1801253)				0.67			0.72
GG	3	3.45			1 (33.3)	2 (66.7)	
CG	28	4.77			16 (61.5)	10 (38.5)	
CC	19	4.55			12 (63.2)	7 (36.8)	
ADRB2 Arg16Gly (rs1042713)				0.06			0.83
AA	19	5.44			10 (58.8)	7 (41.2)	
AG	13	4.51			8 (57.1)	6 (42.9)	
GG	19	3.62			12 (66.7)	6 (33.3)	
ADRB2 Gln27Glu (rs1042714)				0.13			0.06
GG	10	3.32			9 (90)	1 (10)	
CG	15	5.17			6 (42.9)	8 (57.1)	
CC	27	4.55			16 (61.5)	10 (38.5)	
ADRB3 Trp64Arg (rs4994)				0.07			1.00
TT	37	4.50			22 (57.9)	16 (42.1)	
TC	8	5.94			5 (62.5)	3 (37.5)	
CC	0	--			-	-	
GNB3 825 C>T (rs5443)				0.77			0.46
TT	6	4.47			5 (83.3)	1 (16.7)	
TC	20	4.15			10 (52.6)	9 (47.4)	
CC	26	4.75			16 (64)	9 (36)	
NOS3 786T>C (rs2070744)				0.35			--
CC	1	4.49			1 (100)	0 (0)	
CT	3	4.61			2 (100)	0 (0)	
TT	4	1.86			2 (100)	0 (0)	
NOS3 Glu298.Asp (rs1799983)				0.57			0.5
GG	3	5.48			3 (100)	0 (0)	
GT	2	0.97			1 (50)	1 (50)	
TT	4	1.96			1 (100)	0 (0)	

Tabla 11: Relación entre los polimorfismos y los niveles circulantes de VEGF-A y ECA en pacientes con cáncer de mama avanzado.

genotipo	n	niveles de VEGF		niveles de ECA		p
		media	p	<135 (n %)	≥135 (n %)	
VEGF -2578C/A (rs699947)			*0.03			0.13
AA	18	4.19		12 (80)	3 (20)	
AC	42	2.93		27 (79.4)	7 (20.6)	
CC	22	4.39		9 (52.9)	8 (47.1)	
VEGF -1498 C/T (rs833061)			*0.03			0.47
TT	20	4.01		11 (64.7)	6 (35.3)	
TC	42	2.93		27 (79.4)	7 (20.6)	
CC	18	4.44		10 (66.7)	5 (33.3)	
FLT VEGFR-1 o FLT (rs9582036)			0.55			0.86
AA	42	3.86		23 (69.7)	10 (30.3)	
CA	32	3.40		19 (76)	6 (24)	
CC	8	3.02		6 (75)	2 (25)	
ECA I/D (rs1799752 o rs4646994)			0.94			0.33
IN/IN	17	3.74		10 (90.9)	1 (9.1)	
IN/DEL	41	3.60		24 (68.6)	11 (31.4)	
DEL/DEL	24	3.50		14 (70)	6 (30)	
AGTR1 A1166C (rs5186)			0.40			1.00
AA	42	3.26		23 (71.9)	9 (28.1)	
AC	35	3.97		23 (74.2)	8 (25.8)	
CC	4	2.95		2 (66.7)	1 (33.3)	
AGT M235T (rs699)			0.94			0.38
TT	34	3.50		17 (65.4)	9 (34.6)	
CT	37	3.68		23 (74.2)	8 (25.8)	
CC	11	3.65		8 (88.9)	1 (11.1)	
ADRB1 Gly389Arg (rs1801253)			0.30			0.83
GG	5	3.39		3 (60)	2 (40)	
CG	40	3.26		25 (73.5)	9 (26.5)	
CC	35	4.11		19 (73.1)	7 (26.9)	
ADRB2 Arg16Gly (rs1042713)			0.61			0.88
AA	30	3.23		16 (76.2)	5 (23.8)	
AG	26	3.80		16 (69.6)	7 (30.4)	
GG	25	3.82		15 (71.4)	6 (28.6)	
ADRB2 Gln27Glu (rs1042714)			0.35			0.28
GG	12	4.49		6 (60)	4 (40)	
CG	40	3.47		25 (69.4)	11 (30.6)	
CC	30	3.42		17 (85)	3 (15)	
ADRB3 Trp64Arg (rs4994)			0.77			0.32
TT	56	3.46		41 (73.2)	15 (26.8)	
TC	4	2.57		3 (75)	1 (25)	
CC	1	3.57		0 (0)	1 (100)	
GNB3 825 C>T (rs5443)			0.07			0.52
TT	12	5.00		7 (87.5)	1 (12.5)	
TC	36	3.26		21 (67.7)	10 (32.3)	
CC	33	3.56		20 (74.1)	7 (25.9)	
NOS3 786T>C (rs2070744)			0.36			0.04
CC	5	3.31		0 (0)	0 (0)	
CT	13	3.74		6 (100)	0 (0)	
TT	5	5.51		0 (0)	2 (100)	
NOS3 Glu298Asp (rs1799983)			0.61			0.46
GG	6	3.35		0 (0)	0 (0)	
GT	11	4.12		3 (60)	2 (40)	
TT	7	4.92		3 (100)	0 (0)	

Tabla 12: Relación entre los polimorfismos y los niveles circulantes de VEGF-A y ECA en pacientes con cáncer colorrectal avanzado.

5.3.3 Relación entre los diferentes polimorfismos y el desarrollo de HTA durante el tratamiento antiangiogénico

No se encontró relación entre los diferentes polimorfismos y el desarrollo de HTA durante el tratamiento con bevacizumab ni en pacientes con cáncer de mama ni colorrectal.

5.4 Relación entre los niveles plasmáticos de ECA y la respuesta al tratamiento antiangiogénico

Los niveles plasmáticos de ECA se relacionaron con la TRG, el TFT y la SG.

En general, se observó que niveles circulantes superiores de ECA se asociaron con la TRG pero sin alcanzar la significación estadística ($p=0.05$) con una media de ECA de 146.78 ± 114.46 ng/mL en los pacientes con RG y de 91.78 ± 35.45 ng/mL en los pacientes con progresión. Al dividir en función de la localización del tumor primario, vimos resultados similares en cáncer colorrectal ($p=0.05$), sin encontrar diferencias en las pacientes con cáncer de mama ($p=0.64$).

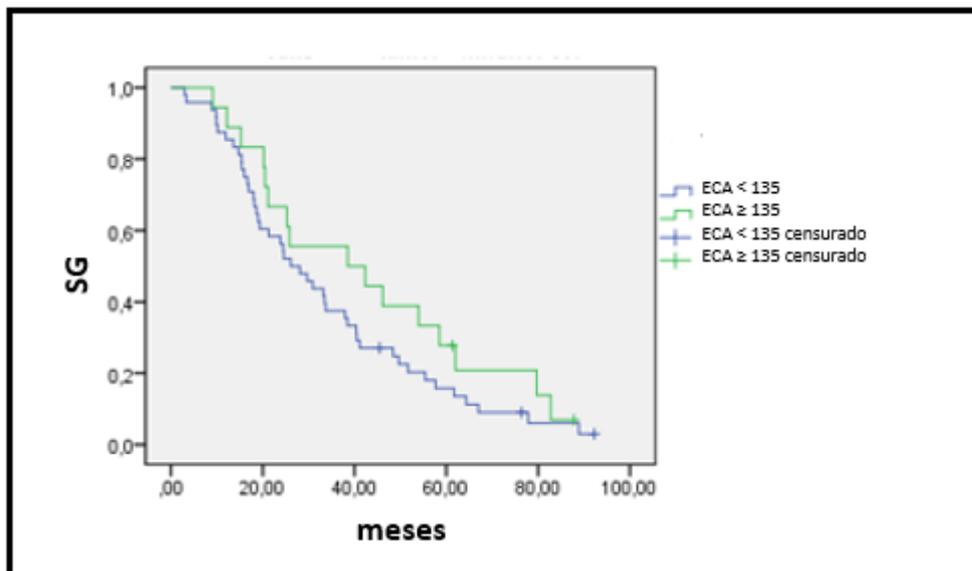
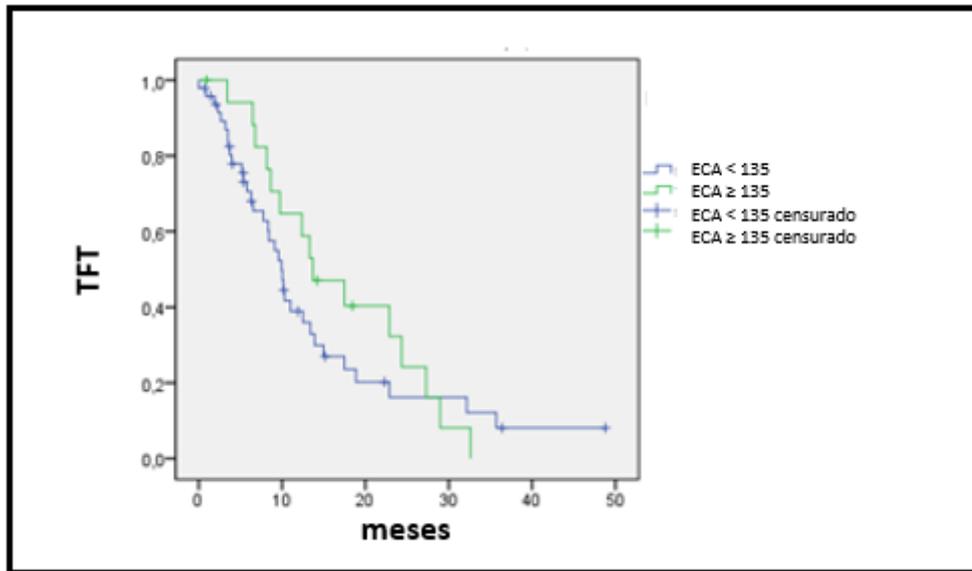
No se encontró asociación estadísticamente significativa entre los niveles de ECA y el TFT considerando la muestra en su conjunto.

En pacientes con cáncer de mama se observó una mediana de TFT de 10.76 meses (IC 95% 7.42-14.11) en pacientes con niveles de ECA < 135 ng/mL y de 10.60 meses (IC 95% 6.27-14.93) en pacientes con niveles de ECA ≥ 135 ng/mL; $p=0.46$; HR=1.27. Sin embargo, en pacientes con cáncer colorrectal se observó que niveles de ECA ≥ 135 ng/mL se asociaron con un TFT mayor pero sin alcanzar la significación estadística, con una mediana de 13.70 meses (IC 95% 7.11-20.21) vs 9.93 meses (IC 95% 7.89-11.98) en aquéllos con cifras de ECA < 135 ng/mL; $p=0.41$; HR=1.29 (ver figura 20).

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los niveles de ECA y la SG considerando la muestra total.

En pacientes con cáncer de mama se observó una mediana de SG de 32.20 meses (IC 95% 17.68-46.72) en pacientes con niveles de ECA < 135 ng/mL y de 22.50 meses (IC 95% 0-45.49) en pacientes con niveles de ECA ≥ 135 ng/mL; $p=0.87$; HR=1.05. Como era de

esperar, en pacientes con cáncer colorrectal, niveles de ECA ≥ 135 ng/mL se asociaron con una SG mayor pero sin alcanzar la significación estadística, con una mediana de 38.50 meses (IC 95% 4.20-75.80) vs 26.10 meses (IC 95% 18.14-34.06) en aquéllos con cifras de ECA < 135 ng/mL; $p=0.22$; HR=1.43 (ver figura 21).



Figuras 20 y 21. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) y supervivencia global (SG) en función de los niveles plasmáticos de ECA en cáncer colorrectal avanzado.

Con la idea de mejorar el posible papel de ECA como valor predictivo de respuesta a bevacizumab, realizamos un análisis combinado de los genotipos del polimorfismo de ECA I/D y los niveles de ECA. Así, se establecieron dos grupos: el grupo A (aquéllos pacientes que presentaron niveles de ECA ≥ 135 ng/mL y genotipos DEL/DEL o IN/DEL [n=35]) y grupo B (aquéllos pacientes con niveles de ECA < 135 ng/mL y genotipo IN/IN [n=12]), viendo que el grupo A tuvo un TFT mayor con una mediana de 13.30 meses (IC 95% 9.05-17.55) vs el grupo B con una mediana de 7.77 meses (IC 95% 1.65-13.88); $p=0.04$ (ver figura 22). No se encontraron diferencias significativas entre estos grupos y la SG.

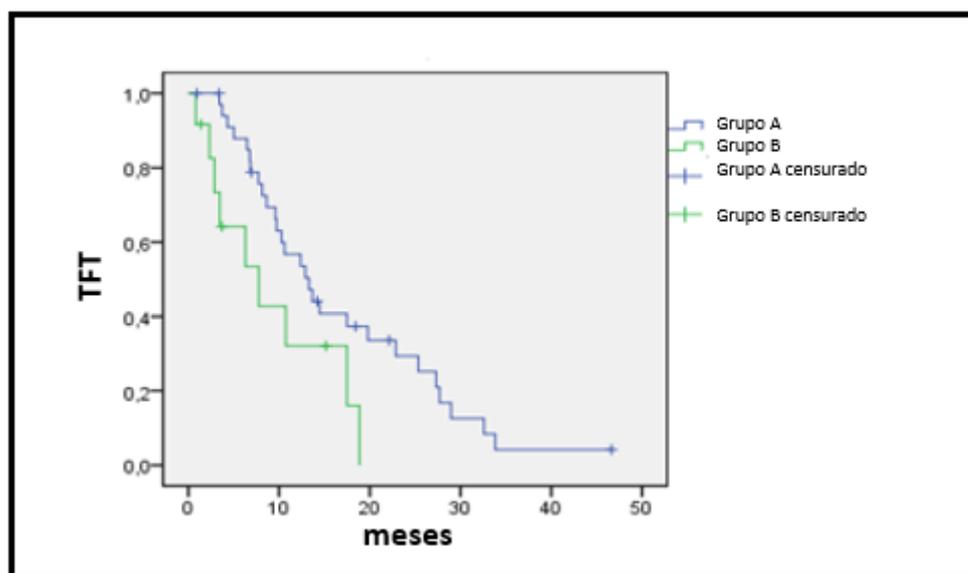


Figura 22. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) en función del grupo A (ECA ≥ 135 ng/mL y genotipos DEL/DEL o IN/DEL) y grupo B (ECA < 135 ng/mL y genotipo IN/IN) considerando todos los pacientes.

5.5 Relación entre los niveles plasmáticos de VEGF-A y la respuesta al tratamiento antiangiogénico

Los niveles de VEGF-A en plasma también se relacionaron con la TRG, el TFT y la SG.

No se encontraron diferencias entre los niveles de VEGF-A en plasma y la TRG, el TFT o la SG considerando todos los pacientes. Pero, en las pacientes con cáncer de mama, niveles mayores de VEGF-A se asociaron con mayor tasa de respuestas de forma estadísticamente significativa ($p=0.02$), así como con una disminución del 20% del riesgo de fallar al tratamiento ($p=0.002$, HR=0.80) sin encontrar diferencias en SG ($p=0.60$, HR=1.03).

En cambio, en pacientes con cáncer colorrectal, no se encontraron diferencias en TRG ($p=0.74$), TFT ($p=0.75$; $HR=1.02$) ni SG ($p=0.54$, $HR=1.03$).

5.6 Relación entre el desarrollo de HTA y la respuesta al tratamiento antiangiogénico

Para conocer el impacto del desarrollo de HTA durante el tratamiento con bevacizumab en nuestra muestra, se correlacionó éste con la TRG, el TFT y la SG.

No vimos diferencias entre la aparición de HTA y la TRG ni considerando todos los pacientes, ni al analizar por separado los pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de mama. Comprobamos de forma global, que los pacientes que experimentaron HTA durante el tratamiento antiangiogénico ($n=28$) presentaron un TFT más largo con una mediana de 20.17 meses (IC 95% 11.55-28.78) vs 10.27 meses (IC 95% 9.13-11.40) en aquéllos que tenían HTA previa y 8.30 meses (IC 95% 6.85-9.75) en el grupo sin HTA, sin alcanzar la significación estadística ($p=0.07$). Además, los pacientes que presentaron HTA tuvieron una SG mayor, con una mediana de 56.17 meses (IC 95% 24.13-88.20) vs 29.87 meses (IC 95% 22.20-37.54) en los que tenían HTA previa y 28.10 meses (IC 95% 18.42-37.78) en aquéllos sin HTA; $p=0.04$ (ver figuras 23 y 24).

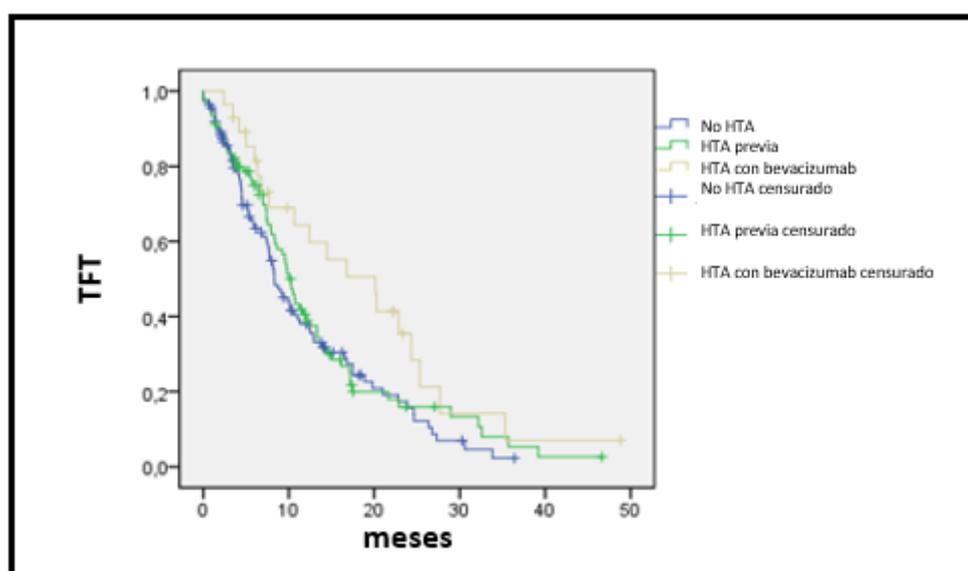


Figura 23. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) en función del desarrollo de hipertensión arterial (HTA) con el tratamiento con bevacizumab (muestra total).

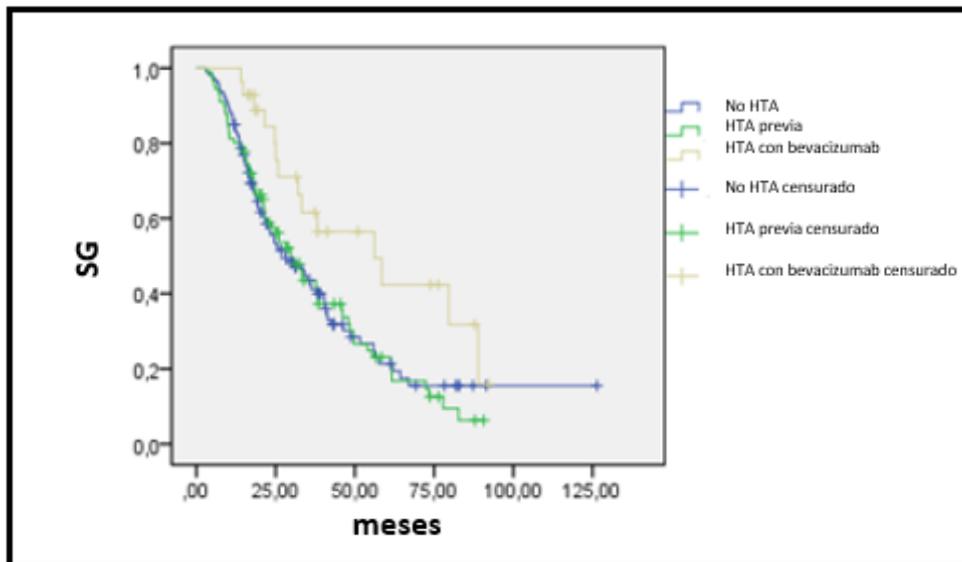
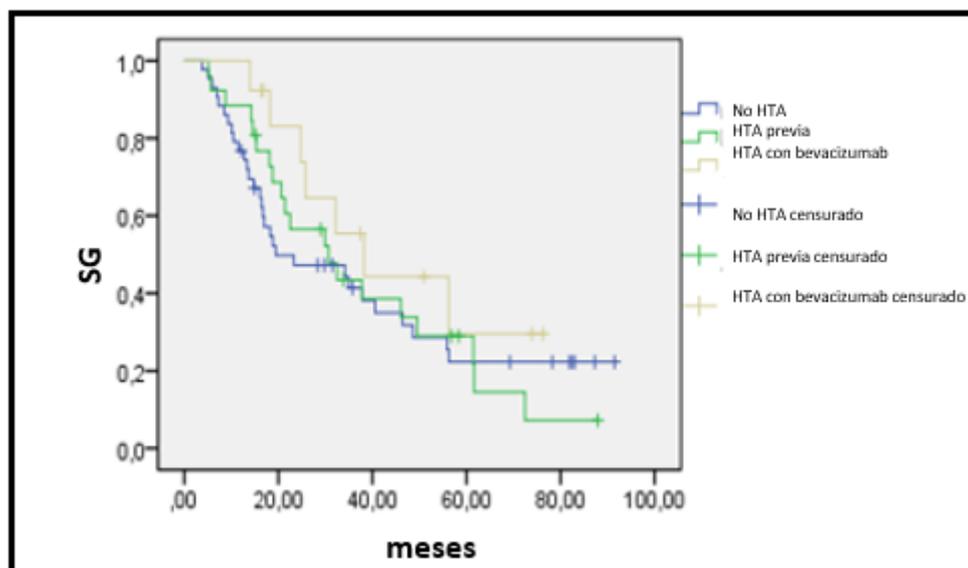
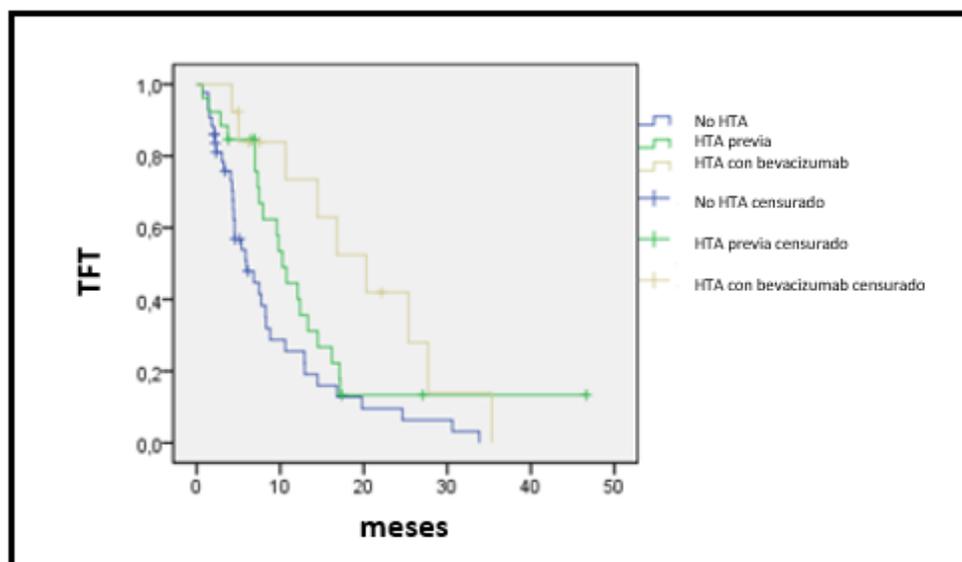


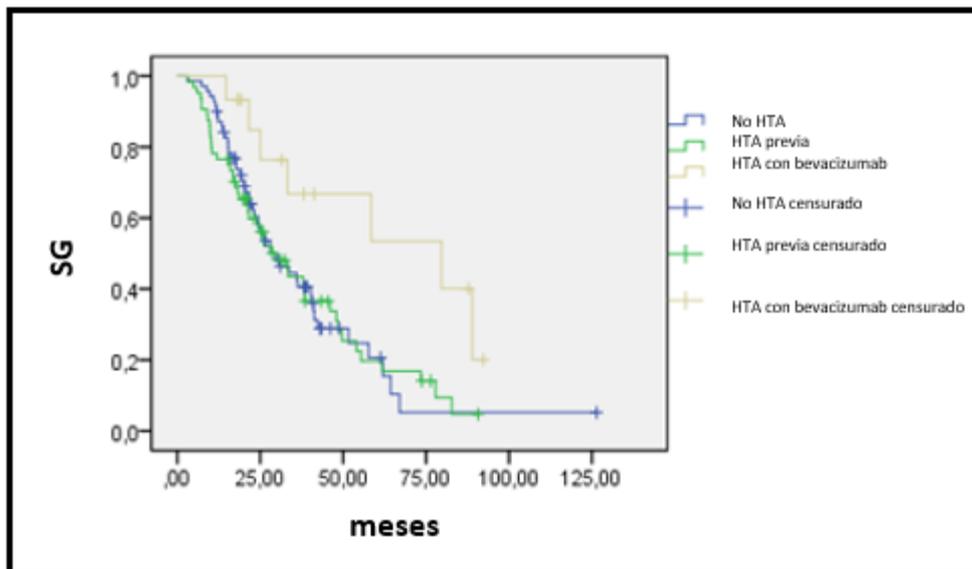
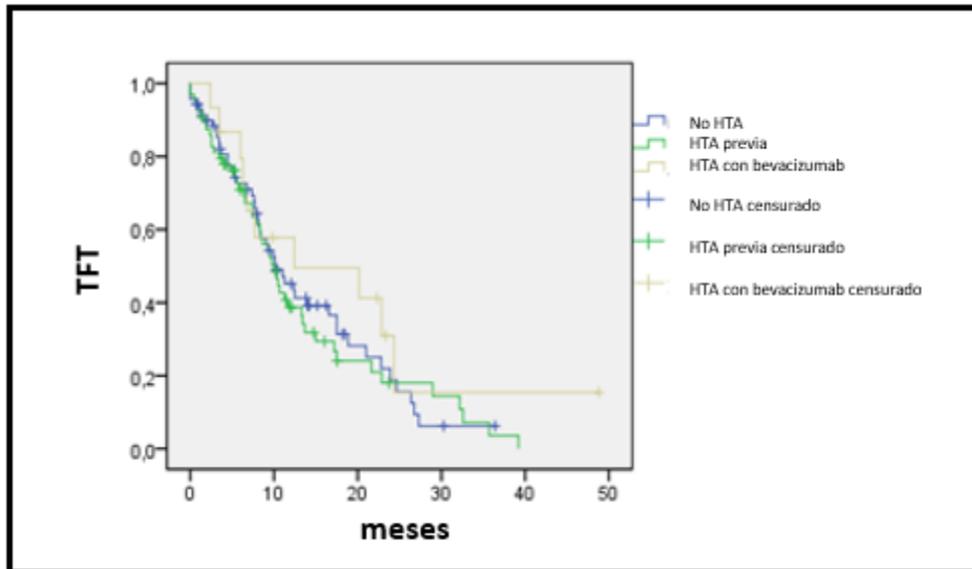
Figura 24. Supervivencia global (SG) en función del desarrollo de hipertensión arterial (HTA) con el tratamiento con bevacizumab (muestra total).

Las pacientes con cáncer de mama que desarrollaron HTA durante el tratamiento con bevacizumab (n=13) tardaron más en fracasar al tratamiento de forma estadísticamente significativa con una mediana de TFT de 20.30 meses (IC 95% 11.73-28.87) vs 10.27 meses (IC 95% 8.48-12.05) en el grupo de HTA previa vs 5.97 meses (IC 95% 2.92-9.02) en el grupo de pacientes sin HTA ($p=0.009$). En la misma línea, las pacientes que desarrollaron HTA durante el tratamiento presentaron una mediana de SG mayor: 38.20 meses (IC 95% 21.70-54.70) vs 30.67 meses (IC 95% 15.49-45.84) en las pacientes con HTA previa vs 19.47 meses (IC 95% 0-39.76) en las pacientes sin HTA en ningún momento, pero sin alcanzar la significación estadística ($p=0.47$) (ver figuras 25 y 26).



Figuras 25 y 26. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) y supervivencia global (SG) en función del desarrollo de hipertensión arterial (HTA) en pacientes con cáncer de mama avanzado.

En pacientes con cáncer colorrectal, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el desarrollo de HTA durante el tratamiento antiangiogénico (n=15) y el TFT, sí se encontraron en la SG. Vimos una mediana de TFT de 12.43 meses (IC 95% 0-32.61) vs 10.03 meses (IC 95% 7.88-12.18) en los pacientes con HTA previa vs 10.17 meses (IC 95% 6.93-13.40) en los pacientes sin HTA (p=0.47). En relación a la SG, hallamos una mediana de 79.67 meses (IC 95% 29.23-129.11) en los pacientes con HTA durante el tratamiento con bevacizumab vs 29.80 meses (IC 95% 21.41-38.19) en los pacientes con HTA previa vs 29.67 meses (IC 95% 20.04-39.29) en los pacientes sin HTA (p=0.04) (ver figuras 27 y 28).



Figuras 27 y 28. Tiempo al fallo de tratamiento (TFT) y supervivencia global (SG) en función del desarrollo de hipertensión arterial (HTA) en pacientes con cáncer colorrectal avanzado.

5.7 Relación entre desarrollo de HTA y niveles de VEGF-A y ECA en plasma

No se encontró relación entre el desarrollo de HTA y los niveles circulantes de ECA independientemente de considerar la muestra en su totalidad o en función de la localización del tumor primario ($p=0.53$, $p=0.78$ y $p=0.53$ para la muestra total, cáncer de mama y colorrectal respectivamente). Lo mismo sucedió con los niveles plasmáticos de VEGF-A ($p=0.69$, $p=0.55$ y $p=0.81$ para la muestra en su conjunto, cáncer de mama y colorrectal respectivamente).

5.8 Modelo experimental

En nuestro análisis, el genotipo AA del polimorfismo A1166C (rs5186) de AGTR-1, que se ha asociado con una disminución de los niveles de ARNm de AGTR-1 y de la acción de la AT-II²²³, se asoció a un aumento de la tasa de progresión de la enfermedad. Quisimos confirmar si un eje ECA-AT II-AGTR1 activado se asociaba a una respuesta mejor al tratamiento con bevacizumab. Para ello, se analizó la actividad antitumoral de bevacizumab en los tumores originados de células MCF7 de xenoinjertos ortotópicos de cáncer de mama con sobreexpresión o no de AGTR-1 [figura 29 (a)]. El volumen tumoral de los xenoinjertos derivados de células MCF7 que sobreexpresaban AGTR-1 fue menor de forma significativa en los ratones tratados con bevacizumab. En cambio, los tumores de los xenoinjertos de las células de control no se vieron afectados por el tratamiento con bevacizumab [figura 29 (b)].

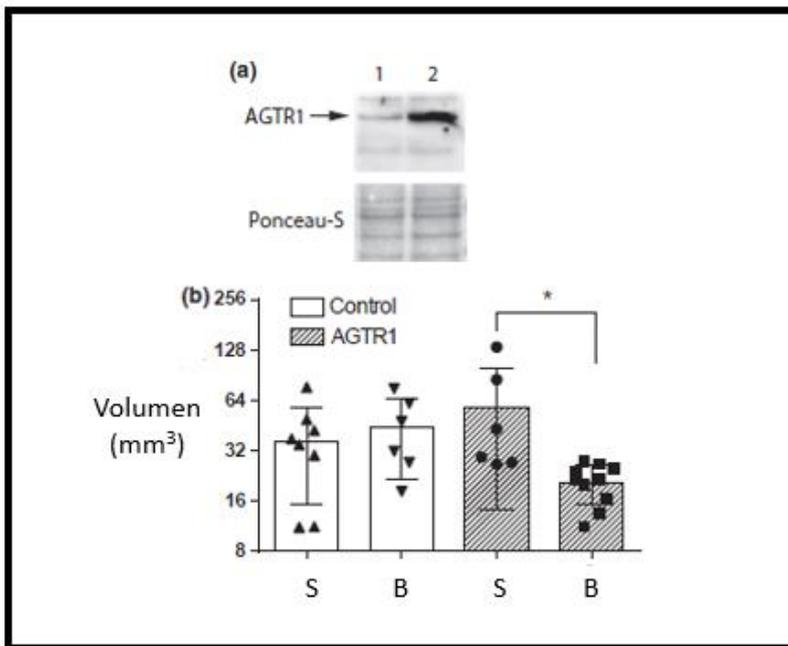


Figura 29. Efecto del tratamiento con bevacizumab en los niveles de expresión de AGTR-1. (a): expresión de AGTR-1 en células control (1) y en células que sobreexpresan AGTR-1 (2). (b): volumen tumoral de los xenoinjertos (escala log2) generados con células MCF7 (control, barras blancas) y con células MCF7 que sobreexpresan AGTR-1 (barras grises). Los ratones fueron tratados con salino (S) o con bevacizumab (B). Se representa la media (altura de la barra) con el error estándar. * p<0.05.

Además, en colaboración con el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), se llevó a cabo otro experimento donde vimos el efecto de la adición de AT-II y un anti-VEGF murino (B20).

Un total de 35 ratones modificados genéticamente para desarrollar cáncer de mama fueron divididos en 4 grupos en función del tratamiento recibido (vehículo, antiangiogénico B20, AT-II o AT-II y B20).

Se analizó la curva de crecimiento tumoral, observando que los tumores del grupo que recibió AT-II fueron los que mayor crecimiento experimentaron (ver figura 30). Además, al explorar la carga tumoral en las diferentes semanas vimos, en concordancia con los resultados previos, que el volumen tumoral de los ratones que recibieron AT-II y B20 fue menor en comparación con el resto de grupos (ver figura 31).

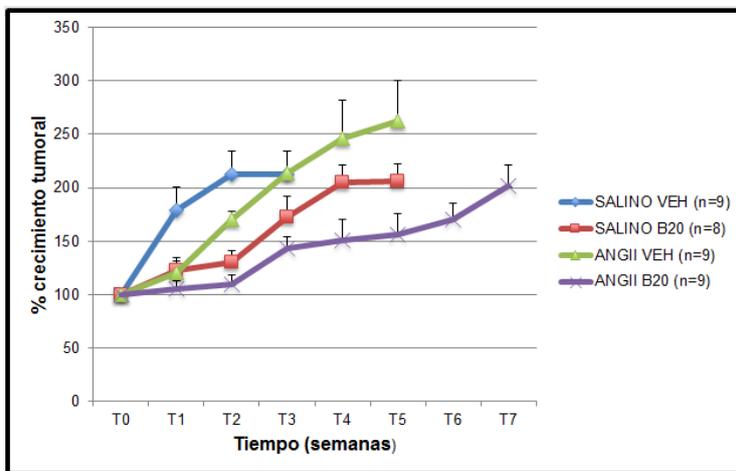


Figura 30. Crecimiento tumoral de ratones tratados. T0 hace referencia al momento de inicio de tratamiento.

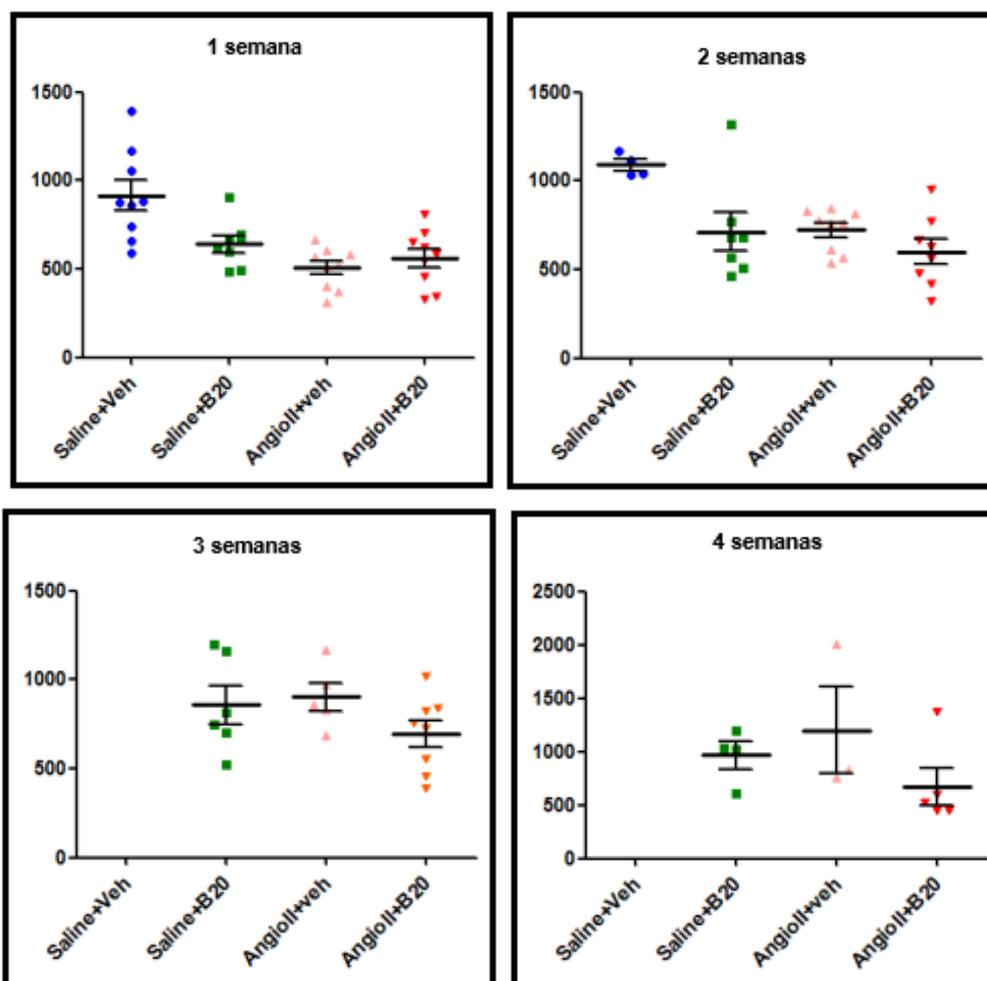


Figura 31. Evolución de la carga tumoral de los ratones tratados.

La mediana de supervivencia fue de 14 días (IC 95% 11.39-16.60) para el grupo 1 (con vehículo), de 21 días (IC 95% 14.76-27.24) para el grupo 2 (con B20), de 21 días (IC 95% 14.07-27.93) para el grupo 3 (con AT-II) y de 28 días (IC 95% 7.54-48.45) para el grupo 4 (con AT-II y B20). Al comparar entre grupos observamos diferencias significativas entre el grupo 1 y los grupos 3 ($p=0.04$) y 4 ($p=0.006$); así como entre el grupo 3 y el grupo 4 ($p=0.04$) (ver figura 32).

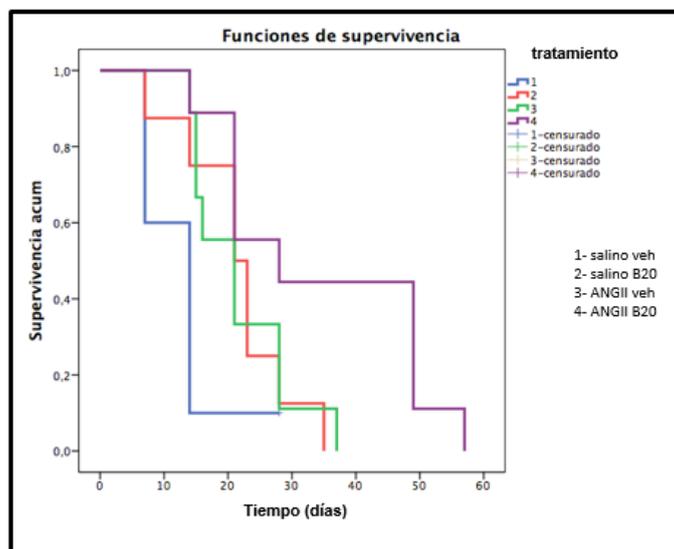


Figura 32. Supervivencia global (SG) de ratones desde el inicio de tratamiento hasta el sacrificio.

6.DISCUSIÓN

La determinación de biomarcadores predictivos de respuesta a tratamientos específicos se ha convertido en un pilar básico de la oncología, lo cual permite seleccionar a los pacientes que pueden beneficiarse de una terapia concreta, evitando de esta manera efectos secundarios y costes innecesarios.

Una de las razones por la que es tan difícil encontrar marcadores predictivos clínicos relevantes para bevacizumab es la complejidad biológica de la angiogénesis tumoral, que constituye una de las características principales de las células neoplásicas²²⁴. En los últimos años, los datos destacan el papel de múltiples vías implicadas en el crecimiento de nuevos vasos tumorales, vías de “escape angiogénico” que emergen de forma independiente a VEGF-A o que se activan debido al estrés hipóxico sufrido por el tumor, lo que sugiere que se debería investigar la inhibición simultánea de múltiples objetivos angiogénicos como estrategia potencialmente eficaz²²⁵, complicando así el descubrimiento de un biomarcador único efectivo. Otro factor que dificulta la investigación de biomarcadores de bevacizumab es que como agente único tiene un efecto antitumoral muy limitado, por lo que el efecto de confusión de la QT eclipsa el efecto del mismo¹⁴³.

Sabemos, que la capacidad de VEGF para estimular la angiogénesis varía entre individuos, y se ha realizado mucho esfuerzo en la identificación de variantes genéticas de la vía VEGF como posibles biomarcadores de respuesta a terapias antiangiogénicas²²⁶. Sin embargo, no se han descubierto biomarcadores validados en estudios prospectivos hasta la fecha. Nuestro estudio representa el primer análisis de variantes genéticas del SRA y de otros polimorfismos relacionados con la HTA como marcadores predictivos del tratamiento con bevacizumab, habiéndose explorado también polimorfismos de la vía VEGF.

Dado que el tratamiento antiangiogénico no se dirige al tumor, sino al endotelio del huésped, estaría más influenciado por la variabilidad genética del huésped (ADN germinal) que por los cambios somáticos. Además, la determinación de un polimorfismo genético en el ADN germinal representa una prueba "reproducible" y más fácil de realizar, al ser un parámetro estable, en comparación con la medición de mediadores solubles²²⁷. En nuestro estudio, se utilizó línea germinal de ADN (sangre periférica) para la evaluación de los diferentes genotipos. Estudios previos han demostrado que existe

concordancia entre los genotipos de polimorfismos de genes implicados en la angiogénesis determinados en línea germinal y los realizados en línea somática, es decir, en la muestra tumoral. En este sentido, Schneider y cols., observaron que el genotipado de diferentes polimorfismos de los genes VEGF y NOS3 no variaba si se realizaba en línea somática, ya fuera en el tumor primario (mama; n=17) o en la localización metastásica (ganglio; n=17) o en línea germinal (ganglio no afecto; n=19) con una concordancia del 100%, lo que implica que el genotipo angiogénico del huésped marca el genotipo del tumor²²⁸. Si bien es cierto que Coltelli y cols., notificaron un caso de discordancia entre los genotipos de VEGF determinados en el tumor (en la metástasis) y en sangre periférica en una paciente con cáncer de mama metastásico tratado con paclitaxel y bevacizumab²²⁹.

En nuestro estudio contamos con un porcentaje no desdeñable de genotipos no realizados de los polimorfismos NOS3 -786T>C (rs2070744) [48.3%] y NOS3 Glu298Asp (rs1799983) [47.4%], dado que fueron incluidos posteriormente, tras la publicación de trabajos que destacaban su papel en carcinogénesis²¹⁷. El polimorfismo ADRB3 Trp64Arg (rs4994) dejó de hacerse por encontrarse en una frecuencia menor de la que se esperaba, por lo que aparece como no determinado en un 52.6% de los casos. Los casos no realizados del resto de polimorfismos, cuyo resultado varía entre el 2.2 y el 6%, se justifican porque no se obtuvo un resultado claro debido a una calidad deficiente de la muestra.

En relación a la distribución de las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos analizados en nuestra muestra, vemos que algunas de ellas están en desequilibrio de Hardy-Weimberg, lo cual podría explicarse por el tamaño muestral y por el sesgo de selección, dado que la selección realizada de la población hace que las proporciones no sean las reales de la población general, puesto que tienen más características en común entre sus miembros que con el resto de la población (todos tienen cáncer).

Existen varios estudios que han explorado la relación entre diferentes polimorfismos del SRA y el riesgo de desarrollar cáncer²³⁰, si bien es cierto que con resultados contradictorios, lo cual podría deberse a la elección de la población estudiada, a las diferencias étnicas²³¹, a las técnicas de genotipado (que han mejorado con el paso del

tiempo), a otras funciones (desconocidas) del SRA o a su modificación por el empleo de diferentes fármacos²³². Por lo que la discordancia en los resultados en los estudios realizados hasta ahora no deben interpretarse como que no hay asociación entre el SRA y cáncer.

En nuestro análisis, hemos visto que en pacientes con cáncer de mama avanzado, el genotipo IN/IN del polimorfismo ECA I/D (rs1799752 o rs4646994) se asocia con mayor tasa de progresión de la enfermedad a bevacizumab de forma estadísticamente significativa en comparación con IN/DEL y DEL/DEL (50 vs 11.8% respectivamente, $p=0.02$) y con un TFT menor ($p=0.003$). En definitiva, las pacientes con cáncer de mama avanzado portadoras del alelo D podrían beneficiarse de un tratamiento con bevacizumab, pudiendo ser limitada su eficacia en las portadoras de la doble inserción. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias significativas en los pacientes con cáncer colorrectal.

Namazi y cols., tras analizar 70 mujeres con cáncer de mama no metastásico y 70 controles (población iraní), observaron que, cuando se usaba el genotipo DD como referencia, los genotipos II/ID (determinados en tejido de zona no tumoral para evitar posibles mutaciones que pudieran haberse dado en el tumor en el caso de los pacientes, y en sangre periférica en el caso de los controles) se asociaron con un aumento de expresión HER2 en las pacientes con cáncer de mama [$p=0.020$; OR=4.58 IC 95% 1.26-16.60], lo que sabemos que confiere un peor pronóstico²³³. Los autores postulan que, debido a la localización del polimorfismo I/D de ECA en la región intrónica del gen, podría ocurrir un desequilibrio de ligamiento con otros polimorfismos²³⁴ y darse una asociación entre el polimorfismo ECA I/D con HER2 al estar ambos genes ubicados en el mismo cromosoma (cromosoma 17), cerca de uno otro. Tres años más tarde, publicaron los resultados tras estudiar un total de 110 muestras de tejido tumoral, observando que el genotipo DD se asoció con un aumento de la SLE a 3 años en comparación con I/D e I/I (HR=4.75; IC 95% 1.39-16.24, $p=0.013$)²³⁵. Alves Correa y cols., dentro de su estudio en población brasileña con 101 casos con cáncer de mama y 307 controles, también relacionaron el SRA con factores pronósticos, observando que el genotipo II del polimorfismo I/D de ECA (ADN extraído de células de mucosa oral) era 2.5 veces más frecuente que el resto de genotipos en estadios avanzados de la enfermedad¹⁸⁰. Igualmente, otros autores han evaluado la relación entre el polimorfismo I/D de ECA y factores clínico-patológicos, pero encontrando que el genotipo DD es el que se asocia a factores de mal pronóstico. En este sentido Yaren y cols., observaron en 57 pacientes turcas con cáncer de mama y 52

controles, que el genotipo DD (determinado en sangre periférica) se relacionó con la presencia de RH negativos ($p=0.003$), el tamaño tumoral ($p=0.054$) y la afectación ganglionar ($p=0.07$)²³⁶. En otro estudio con 113 pacientes intervenidos de cáncer gástrico, aunque no hubo diferencias en la distribución de los genotipos (determinados en sangre periférica o en tejido) entre los pacientes con o sin cáncer, el genotipo DD, se asoció con un número mayor de ganglios linfáticos afectados en comparación con el genotipo II ($p<0.001$; OR=7.9; IC 95% 1.97-32.01), así como con estadios más avanzados (el 58% de pacientes con el genotipo II fueron estadios I-II, mientras que el 78% de los pacientes con el genotipo DD fueron estadios III-IV; $p=0.01$; OR=5 IC 95% 1.56–16.06)²³⁷. Además, en cáncer de próstata y en población china, Wang y cols, constataron en otro estudio de casos ($n= 189$) y controles ($n= 290$), que el genotipo DD se vinculó con un estadio más avanzado (OR=2.21 IC 95% 1.17- 4.19, $p=0.014$) y con una edad menor al diagnóstico (< 71 años) (OR=0.51 IC 95% 0.27-0.96, $p=0.037$). Por otra parte, el genotipo II (OR=0.30 IC 95% 0.18-0.51, $p<0.001$) y alelo I (OR=0.55 IC 95% 0.42-0.71, $p<0.001$) se correlacionaron con un riesgo menor de cáncer de próstata en comparación con el genotipo DD y el alelo D²³⁸.

El polimorfismo I/D de ECA se ha relacionado con los niveles séricos de ECA, de tal forma que el genotipo DD predispone a concentraciones mayores de ECA en suero¹⁷⁷. Además, *in vitro*, se ha visto una conexión directa entre dicho polimorfismo y los niveles de AT-II en las células endoteliales vasculares con genotipo DD, con niveles más altos de AT-II en comparación con las células con genotipo II²³⁹. En nuestro estudio se determinó la concentración de ECA en plasma en 116 pacientes, hallando cifras superiores en aquéllos pacientes con genotipo DD e inferiores en aquéllos con genotipo IN/IN, pero sin encontrar diferencias significativas, lo cual podría justificarse por el tamaño muestral.

Se ha postulado que niveles superiores de ECA predisponen al desarrollo de cáncer y que el empleo de iECAS bloquea la proliferación celular y el potencial metastásico del tumor, parece que debido a la inhibición de las actividades pro-angiogénicas del SRA aunque los resultados al respecto son discordantes²⁴⁰. Nuestro estudio es el primero que relaciona los niveles séricos de ECA con la TR, el TFT y la SG en pacientes con tratamiento antiangiogénico.

Respecto a los niveles de ECA considerados, al carecer de cifras preestablecidas, se analizaron diversos puntos de corte, encontrando que 135 ng/mL fue el valor más discriminativo. Posteriormente, Bar y cols., analizaron de forma retrospectiva los niveles de ECA en suero en pacientes con cáncer de pulmón de células grandes avanzado pertenecientes a un estudio fase II-III que evaluó la eficacia de cediranib junto con QT vs placebo-QT en primera línea. Concluyeron que niveles bajos de ECA se relacionaron con una SG menor en el grupo que recibió placebo (HR=0.49 IC 95% 0.31-0.78; p=0.002). Además, sólo los pacientes con niveles menores de ECA mostraron beneficio en SG tras tratamiento con cediranib (p=0.05), comportándose por tanto como factor pronóstico y predictivo de respuesta a cediranib, utilizando como punto de corte 115 ng/mL²⁴¹. Nosotros hemos visto que niveles de ECA superiores se asocian con un aumento en la TRG (p=0.05) en pacientes con cáncer colorrectal, sin encontrar diferencias en las pacientes con cáncer de mama (p=0.64), si bien es cierto que en este subgrupo se analizaron menos pacientes.

Con el propósito de mejorar el posible papel de ECA como valor predictivo de respuesta a bevacizumab, llevamos a cabo un análisis combinado de los genotipos del polimorfismo de ECA I/D y los niveles de ECA, observando que aquéllos pacientes que presentaron niveles de ECA \geq 135 ng/mL y genotipos DEL/DEL o IN/DEL tuvieron un TFT mayor que aquéllos con niveles de ECA < 135 ng/mL y genotipo IN/IN (p=0.04). Este hallazgo ha dado pie a trabajos posteriores como el análisis del estudio LEA (ensayo clínico aleatorizado que comparó tratamiento hormonal con o sin bevacizumab en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama avanzado con RH positivos y HER2 negativo con indicación de HT en primera línea) donde se evaluó el papel de ECA como biomarcador pronóstico y/o predictivo del beneficio de bevacizumab. Sus resultados se publicaron en el congreso de ESMO de 2016, constatando que niveles de ECA < 135 ng/mL se asociaron a una SLP mejor en la población global (p=0.048) y en el brazo de bevacizumab con HT (p=0.041), sin encontrar diferencias cuando emplearon como punto de corte un valor de ECA de 115 ng/mL²⁴².

Dentro del SRA, también cabe destacar el polimorfismo AGT M235T (rs699), habiendo observado que las pacientes con cáncer de mama con el genotipo CT presentaron un TFT menor (p=0.03) y una SG menor (p=0.04) en comparación con TT y CC, así como una mayor tasa de progresión aunque sin diferencias estadísticamente significativas (p=0.07).

Podríamos sugerir que las pacientes con cáncer de mama portadoras del genotipo en homocigosis se benefician en mayor medida de bevacizumab.

Varios estudios han demostrado que el polimorfismo AGTR1 A1166C se asocia con una mayor predisposición a la HTA y al daño de órganos diana²⁴³. En nuestro análisis, el genotipo AA se asoció con una tasa de progresión de la enfermedad superior en comparación con los genotipos AC y CC ($p=0.05$) en los pacientes con cáncer colorrectal. Curiosamente, la expresión de AGTR-1, que se correlaciona positivamente con la presión sanguínea sistólica y diastólica, es superior en las personas con genotipo CC²⁴³. Además, el genotipo CC se ha asociado con una forma de hipertensión esencial caracterizada por niveles plasmáticos altos de aldosterona y bajos de renina, posiblemente debido al aumento de los niveles de ARNm de AGTR1 y un aumento de la acción de la AT-II²²³. Por lo tanto, el alelo A, cuando está presente en forma homocigota puede estar relacionado con un eje AT II-AGTR1 menos activado y con una mayor tasa de progresión de la enfermedad en pacientes tratados con bevacizumab. Aparte este polimorfismo se ha relacionado con factores pronóstico conocidos como lo es la clasificación TNM. Namazi y cols., además de explorar el polimorfismo I/D de ECA comentado previamente, observaron que el genotipo AC se asoció con un TNM más avanzado (OR=4.66; IC 95% 1.18-18.35; $p=0.024$)²³³. En su publicación posterior concluyeron que no había asociación significativa entre el polimorfismo AGTR1 A1166C y la SLE a 3 años (HR=1.76; IC 95% 0.69-4.44; $p=0.233$)²³⁵.

Las funciones precisas del SRA y la vía del receptor AT II-AGTR1 en la angiogénesis no están claras. En modelos in vivo con melanoma en ratones genéticamente modificados para carecer de AGTR-1 se ha visto que la angiogénesis disminuye en ausencia de AGTR-1 y consecuentemente lo hace el crecimiento tumoral constatando asimismo una supervivencia mayor en este supuesto. Tras administrar un antiangiogénico el tamaño del tumor disminuye tanto en los ratones wild type como en los deficientes de AGTR-1 en comparación con los wild type y los deficientes de AGTR-1 que no reciben tratamiento, pero de forma más marcada en los wild type²⁴⁴. Nuestros experimentos in vivo han mostrado que la actividad antitumoral de bevacizumab es significativamente mayor en las células tumorales de cáncer de mama con sobreexpresión de AGTR-1.

Sabemos que AT-II, que es la efectora del SRA, estimula la producción de VEGF por parte de la vasculatura de las células del músculo liso y de las células endoteliales, promoviendo la angiogénesis a través de la activación de AGTR-1, lo que conduce a una transactivación de VEGFR independientemente de VEGF. Además, la activación de AGTR-1 también inicia la señalización de vías que dan lugar a una mayor expresión de genes que participan en la respuesta temprana como c-fos, c-jun y c-myc, que están involucrados en la remodelación de la matriz extracelular y la proliferación celular ²⁴⁰. En nuestro modelo experimental observamos que tras la administración de AT-II a ratones genéticamente modificados para desarrollar cáncer de mama, aumentó el volumen tumoral y además se constató una respuesta mayor al tratamiento antiangiogénico en el grupo que recibió además AT-II.

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que una mayor actividad del eje ECA-AT II-AGTR1 se asocia a una respuesta mejor al tratamiento antiangiogénico con bevacizumab.

Se han estudiado otros polimorfismos relacionados con la HTA, de los que resaltamos los polimorfismos del gen de NOS3. El polimorfismo Glu298Asp (rs1799983) no se encuentra en ninguna secuencia funcional conocida del gen. Sin embargo, el polimorfismo 786T>C (rs2070744) se localiza en la región flanqueante del lado 5' y ha demostrado suprimir la transcripción del gen NOS3, postulándose que mutaciones del mismo podrían ser responsables de una disminución de la producción de NO endotelial²⁴⁵. Se ha analizado la relación entre estos polimorfismos y el riesgo de cáncer con resultados inconsistentes, lo que ha motivado la realización de diversos metaanálisis, si bien es cierto que éstos son difíciles de interpretar debido a la heterogeneidad de los trabajos incluidos, con diferencias en el tamaño muestral, en la edad de los pacientes, en la etnia o incluso en la definición de caso y control. Salvatore y cols., evaluaron la relación entre ambos polimorfismos y la respuesta al tratamiento con bevacizumab en primera línea (junto con paclitaxel con o sin carboplatino) en un estudio retrospectivo con 31 pacientes italianas con cáncer de mama metastásico HER2 negativo. Constataron que las portadoras del genotipo TT del polimorfismo Glu298Asp (rs1799983) tuvieron una SLP menor que las del genotipo GG (11.5 vs 26.5 meses, p=0.04) sin diferencias en SG ni en la TR y sin encontrar tampoco diferencias con el polimorfismo 786T>C (rs2070744) y la respuesta al tratamiento²⁴⁶. Recordando que nuestra muestra no es homogénea y que bevacizumab se administró en primera línea en el 56.9% de los casos, en nuestro análisis no observamos

diferencias significativas entre los diferentes genotipos de Glu298Asp (rs1799983) y la eficacia de bevacizumab en las pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, vimos que aquéllas con genotipo CT del 786T>C (rs2070744) tuvieron una SG menor ($p=0.034$). En los pacientes con cáncer colorrectal, sí observamos que el genotipo GT del polimorfismo Glu298Asp (rs1799983) se asoció con más progresiones (15.6%) en comparación con los genotipos homocigóticos (0%) ($p=0.05$) y una SG menor ($p=0.01$), sin diferencias en TFT.

No hemos encontrado otras referencias en la literatura sobre estudios que traten de asociar estos polimorfismos con la evolución de la enfermedad durante el tratamiento con bevacizumab.

Se han desarrollado diferentes trabajos que evalúan la relación entre estos polimorfismos y determinados factores pronóstico. En este sentido, en cáncer de mama, Ghilardi y cols., sugirieron que una disminución de la presencia de alelo T del polimorfismo 786T>C (rs2070744) de NOS3, con la consecuente actividad transcripcional inferior del gen NOS3, se asoció a una disminución de la probabilidad de invasión linfovascular (factor pronóstico independiente desfavorable para recaída y supervivencia bien conocido²⁴⁷) en una cohorte de mujeres italianas con cáncer de mama precoz (71 pacientes con cáncer y 91 controles), y en el seguimiento, se correlacionó con una disminución de la probabilidad de presentar enfermedad metastásica futura, proponiéndolo como un posible factor pronóstico favorable. Asimismo, estudiaron el polimorfismo Glu298Asp (rs1799983), pero sin encontrar diferencias significativas²⁴⁵. Nosotros observamos que las pacientes con cáncer de mama con genotipo CC del polimorfismo NOS3 786T>C presentaron un TFT mayor y no llegaron a alcanzar la mediana de SG, si bien es cierto que el número de pacientes en este subgrupo era muy limitado ($n=5$), lo que dificulta sacar conclusiones. Por otro lado, en cáncer colorrectal, Arikian y cols., observaron, después de realizar el genotipado en 84 pacientes con cáncer y 99 controles en población turca, que ser homocigoto (TT o GG) para el polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) se relacionó con un estadio más avanzando ($p=0.042$)²⁴⁸.

La vía de VEGF ha sido más explorada en este sentido. Conocemos que los polimorfismos en línea germinal de VEGF influyen en la expresión de VEGF por parte de las células normales por lo que podrían participar en la tumorigénesis, la progresión tumoral y la respuesta a agentes anti-VEGF¹⁴⁵. Varios estudios han investigado la función de diferentes polimorfismos de VEGF en línea germinal como predictores de respuesta a

bevacizumab. Nosotros hemos explorado los polimorfismos VEGF -1498 C/T (rs833061), VEGF -2578 C/A (rs699947) (dos polimorfismos de la zona del promotor de VEGF que constituye un punto de regulación crucial) y VEGFR-1 o FLT (rs9582036).

Algunos estudios han encontrado relación entre el polimorfismo VEGF -1498 C/T (rs833061) y la evolución de los pacientes con bevacizumab, si bien es cierto que los resultados son discordantes^{143,144}. En nuestro análisis, no encontramos diferencias significativas entre dicho polimorfismo y la TRG, TFT o SG. En la misma línea, Loupakis y cols., tampoco observaron de forma prospectiva en pacientes italianos con CCRm en primera línea con FOLFIRI-bevacizumab (controlado con pacientes que recibían sólo FOLFIRI) (n=424) diferencias significativas entre los genotipos del SNP VEGF -1498 C/T y SLP ni SG¹⁴³. Resultados parecidos concluyeron Sibertin-Blanc y cols., en un análisis retrospectivo en el que no vieron relación entre dicho polimorfismo y el TFT, SG y TR al tratamiento con QT-bevacizumab en 89 pacientes con CCRm¹⁴⁸. De forma similar, en cáncer de mama y de forma prospectiva, Etienne-Grimaldi y cols., constataron que VEGF -1498 C/T no influyó en la respuesta al tratamiento, ni en el tiempo a la progresión ni en la SG en 137 pacientes en primera línea con QT-bevacizumab¹⁴⁷. Otro estudio negativo, publicado por Loupakis y cols., mostró que VEGF -1498 C/T no se asoció con los resultados clínicos (en términos de SLP) en 54 pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con FOLFOXIRI-bevacizumab¹³⁵. En la misma dirección, en el estudio ACT, fase III que analizó a 218 pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con QT-bevacizumab de forma prospectiva, no se pudo proponer a este polimorfismo como un biomarcador potencial al no asociarse con la TR¹⁴⁹. Asimismo, Koutras y cols., publicaron que no había asociación entre el SNP VEGF 1498 y la TR, SLP y SG en 173 pacientes en tratamiento con QT-bevacizumab en primera línea¹⁴⁶. En cambio, Sohn y cols., en 125 pacientes coreanos provenientes de dos estudios fase II con CCRm en tratamiento de primera y segunda línea con QT-bevacizumab, observaron que el genotipo TT se asoció con una TR superior en comparación con CT y CC (75.9 vs 50.8%; p=0.008)¹⁴⁴.

En relación a factores pronósticos conocidos, cabe destacar el trabajo de Yamamori y cols., quienes demostraron en 36 pacientes japoneses con cáncer colorrectal, que el alelo C del polimorfismo VEGF -1498 en línea germinal fue predictivo de tumores poco diferenciados y, por lo tanto, de mal pronóstico (p=0.064 para el genotipo, p=0.037 para el alelo)²⁴⁹. En cáncer de mama, Zheng y su grupo evaluaron los datos del *Shanghai*

Breast Cancer Study, un estudio de casos controles que fue diseñado para reclutar a todas las mujeres recién diagnosticadas en Shanghai de cáncer de mama con edad entre 25 y 64 años entre agosto de 1996 y marzo de 1998 (con información del genotipado en 1119 pacientes), donde el genotipo CC del polimorfismo VEGF -1498C> T se asoció con una SG y SLE menores (HR=1.5 para ambas)²⁵⁰, sin encontrar relación con el riesgo de cáncer de mama²⁵¹.

En el caso del polimorfismo VEGFR-1 o FLT (rs9582036), sí encontramos diferencias en las pacientes con cáncer de mama avanzado, de tal manera, que aquéllas con genotipo CC presentaron una SG menor en comparación con el resto de grupos (p=0.005). En concordancia con ello, en los pacientes con CCRm del fase III ACT, ya mencionado, se observó de manera prospectiva que los portadores del genotipo CC presentaron una TR menor a primera línea de QT-bevacizumab en comparación con el resto de genotipos (p=0.048)¹⁴⁹. Sin embargo, en nuestro análisis no encontramos diferencias en el grupo de pacientes con CCR. Tampoco, Cremolini y cols., encontraron diferencias en un análisis prospectivo con 424 pacientes entre el polimorfismo VEGFR-1 o FLT (rs9582036) y el beneficio clínico en términos de SLP con FOLFIRI-bevacizumab en primera línea¹⁵⁰. Lambrechts y cols., relacionaron de manera retrospectiva 138 SNP de la vía de VEGF con la SLP y la SG en una población de 154 pacientes de raza blanca del estudio AVITA (fase III que comparó gemcitabina-erlotinib con o sin bevacizumab en pacientes con cáncer de páncreas metastásico), de los que 77 recibieron bevacizumab observando que sólo el VEGFR-1 o FLT (rs9582036) se asoció con SG (p=0.00014) y SLP (p=0.00081) en el grupo que recibió bevacizumab. Al igual que en nuestros resultados, observaron que aquéllos con genotipo CC presentaron una SG menor²²⁶.

En cuanto al polimorfismo VEGF -2578 C/A (rs699947) constatamos diferencias significativas en los pacientes con cáncer colorrectal, hallando más progresiones en aquéllos con el genotipo AA vs CC y AC: 24.2 vs 8.8 y 3.9 % respectivamente (p=0.006). Análogamente, los del genotipo AA tuvieron un TFT y SG menores (p=0.003 y p=0.05 respectivamente).

En cambio, Loupakis y cols., no encontraron relación entre dicho polimorfismo y la SLP en 54 pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con FOLFOXIRI-bevacizumab¹³⁵. En la misma dirección, el estudio ACT, ya comentado, tampoco pudo proponer a este polimorfismo como un biomarcador potencial al no asociarse con la TR¹⁴⁹. De la misma manera, Koutras y cols., publicaron que no había asociación entre el

polimorfismo VEGF- 2578 y la TR, la SLP o la SG en pacientes con CCR en tratamiento con QT-bevacizumab en primera línea¹⁴⁶. Asimismo, en una gran cohorte retrospectiva con 403 pacientes con CCR tratados con bevacizumab no se encontraron diferencias entre dicho polimorfismo y la SG¹⁵¹.

En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias entre el polimorfismo VEGF - 2578C/A (rs699947) y el beneficio con bevacizumab en las pacientes con cáncer de mama. De forma similar, Etienne-Grimaldi y cols., que también analizaron este polimorfismo en el estudio prospectivo nombrado previamente, concluyeron que VEGF -2578 no intervino en la respuesta al tratamiento, ni en el tiempo a la progresión ni en la SG en pacientes tratadas en primera línea con QT-bevacizumab¹⁴⁷. Sin embargo, Schneider y cols., observaron que en las pacientes del estudio ECOG2100 (estudio fase III que comparó paclitaxel versus paclitaxel más bevacizumab en primera línea de cáncer de mama metastásico), el genotipo AA (realizado en tejido tumoral de 180 casos del brazo experimental y de 183 casos del brazo de control) predijo una mediana de SG mayor en las pacientes del brazo de la combinación, lo cual no ocurrió en el brazo control, apoyando el hecho de que pueda considerarse un marcador predictivo (no pronóstico) (HR=0.58; IC 95% 0.36-0.93; p=0.023)¹⁰⁵. Por otro lado, Jin y cols., observaron en un estudio casos-contróles con 571 casos de cáncer de mama familiar y 974 casos de cáncer de mama no seleccionados en población caucásica, que el genotipo AA se asoció a tumores de bajo grado histológico (p=0.04)²⁵². En cambio, no se ha encontrado correlación entre este polimorfismo y diferentes variables pronósticas como son el tamaño tumoral, el grado histológico, la presencia de metástasis ganglionares regionales o el estadio tumoral en pacientes con CCR²⁵³.

Estos resultados contradictorios podrían deberse a factores étnicos y ambientales que contribuyen a la variabilidad de los polimorfismos. Son necesarios estudios prospectivos con un número mayor de pacientes que permitan aclarar las conclusiones al respecto. En este sentido, dentro del estudio E5103 (NCT00433511), un estudio fase III que compara QT estándar adyuvante con o sin bevacizumab en pacientes con cáncer de mama de alto riesgo de recaída, se planteó explorar de forma prospectiva SNPs de VEGF. El reclutamiento de pacientes ya ha finalizado, pero sus resultados aún no han sido publicados.

Además, pudimos ver que los niveles de VEGF-A podían ser influenciados por la presencia de determinados genotipos, de tal manera que, en cáncer colorrectal, se observó que los genotipos AC del polimorfismo VEGF -2578 (rs699947) y TC del polimorfismo VEGF -1498 (rs833061) se asociaron con niveles menores de VEGF-A en plasma ($p=0.03$), sin encontrar diferencias en las pacientes con cáncer de mama. In vitro, se ha visto que las células mononucleadas extraídas de sangre periférica de personas portadoras del genotipo CC del polimorfismo VEGF -2578 producen una cantidad mayor de VEGF²⁵⁴. En pacientes con cáncer, en concreto de mama, tenemos datos provenientes del análisis del estudio ECOG2100 ya comentado, de que el genotipo AA del polimorfismo VEGF-2578 tiende a asociarse con una expresión menor de VEGF (recordando que éste era el grupo que presentó una SG mayor tras tratamiento con bevacizumab), siendo superior en el genotipo CC ($p=0.08$)¹⁰⁵. Yamamori y cols., observaron en tejido tumoral y tejido sano circundante de 18 pacientes japoneses con cáncer colorrectal que los genotipos TC y CC del polimorfismo -1498 de VEGF se asociaron con niveles más elevados de VEGF en el tejido tumoral, pero no en el sano²⁵⁵. En cáncer de pulmón no microcítico, un pequeño estudio con muestras de ADN extraídas de tumores y tejidos pulmonares sanos de 36 pacientes griegos resecados quirúrgicamente, constató que el genotipo CC del SNP VEGF -2578 se correlacionó con una expresión de VEGF menor y con una densidad vascular menor, siendo ambos parámetros superiores en el caso del genotipo AC²⁵⁶. Sin embargo, Balasubramanian y cols., en un estudio de casos y controles en cáncer de mama en población caucásica, no observaron vinculación entre los cuatro polimorfismos que analizaron (-1498C>T, -634G>C, 7,C>T, 936C>T) y los niveles de VEGF en plasma o en suero en una cohorte de 62 mujeres sanas postmenopáusicas²⁵⁷.

Se determinaron los niveles de VEGF-A en plasma y se relacionaron con la respuesta a bevacizumab. Una limitación de este estudio es que los niveles de VEGF-A fueron determinados en 52 pacientes (62.6% de los casos) con cáncer de mama y 82 pacientes (55% de los casos) con cáncer colorrectal. Además, se hizo en cualquier momento del estudio, independientemente de que el paciente estuviera en tratamiento con bevacizumab o no. Sin embargo, las concentraciones de VEGF son dinámicas y pueden variar a lo largo de la enfermedad y durante el tratamiento¹⁴¹. Hay datos de que un aumento de la producción de VEGF puede correlacionarse con un aumento del riesgo y una peor evolución de la enfermedad²²⁷, pero puede que cambios relacionados con el tratamiento tengan un valor predictivo mayor que los valores de VEGF pretratamiento¹⁴¹. De hecho,

Hedge y cols., midieron los niveles séricos de VEGF antes de iniciar el tratamiento en una gran cohorte de pacientes con cáncer (cáncer colorrectal, cáncer renal y cáncer de pulmón) procedentes de cuatro estudios aleatorizados fase III con regímenes de QT con bevacizumab (n=1816) concluyendo que niveles más altos de VEGF pretratamiento influyeron en el pronóstico (aquellos con niveles de VEGF mayores en el grupo tratado sin bevacizumab tuvieron una supervivencia menor), pero no fueron predictivos de respuesta al tratamiento con bevacizumab¹¹⁸. Por otro lado, Hayashi y cols., determinaron los niveles de VEGF en suero antes y durante el tratamiento con QT-bevacizumab en segunda línea en 25 pacientes con CCRm, sugirieron que un aumento precoz de VEGF tras un descenso previo, podría ser un marcador predictivo de resistencia a bevacizumab¹³⁶.

En nuestro trabajo, en las pacientes con cáncer de mama, niveles de VEGF-A mayores se asociaron con una TRG mayor de forma estadísticamente significativa (p=0.02), así como con una disminución del 20% del riesgo de fallar al tratamiento (p=0.002, HR=0.80, sin encontrar diferencias en SG (p=0.60, HR=1.03). En la misma línea, Ramaswamy y cols., de forma prospectiva en un fase II con pacientes con cáncer de mama avanzado que recibieron tratamiento con docetaxel y bevacizumab, determinaron los niveles en suero basales de VEGF (dentro de los primeros 14 días antes del tratamiento) (n=21) y tras el primer ciclo (previo al segundo ciclo, día 1) (n=18), observando que niveles basales altos de VEGF se asociaron a una mayor probabilidad de respuesta tumoral (p=0.03), aunque al eliminar los valores extremos desapareció la significación estadística (p=0.11), sin hacer referencia al efecto en tiempo a la progresión²⁵⁸. En cambio, Burstein y cols. constataron, en otro fase II, que niveles basales bajos de VEGF en plasma se vincularon con un tiempo a la progresión más largo (p=0.012) en 49 mujeres con CMm en tratamiento con vinorelbina y bevacizumab¹²⁴.

Trabajos previos en cáncer colorrectal han mostrado que niveles basales de VEGF elevados se relacionan con una supervivencia menor de los pacientes en tratamiento antiangiogénico¹¹³, aunque el equipo de Keskin observó que pacientes con cáncer de recto en tratamiento con QT-bevacizumab con valores menores de VEGF antes del tratamiento, tuvieron una SG mayor (p=0.026)¹²⁰. Además, considerando que el valor de VEGF es dinámico y puede variar durante la evolución de la enfermedad y con el tratamiento, Marisi y cols., encontraron que aquellos pacientes con CCRm tratados con bevacizumab que presentaron una reducción mayor o igual al 30% en los niveles de ARNm de VEGF desde el inicio hasta la primera evaluación clínica mostraron una SG mayor (p=0.008)¹²¹.

Nosotros no hemos encontrado diferencias entre los niveles séricos de VEGF-A y la TRG ($p=0.74$), el TFT ($p=0.75$; HR=1.02) o la SG ($p=0.54$, HR=1.03) en los pacientes con CCRm. De forma similar, Kopetz y cols., en un estudio fase II con pacientes con CCRm en tratamiento de primera línea con FOLFIRI-bevacizumab no encontraron relación entre los niveles basales en plasma de VEGF y SLP o SG en los 40 pacientes estudiados¹²⁷.

Dado que se ha observado una asociación entre el desarrollo de HTA durante el tratamiento con bevacizumab y la respuesta tumoral sugiriendo que la HTA podría comportarse como un factor predictivo de respuesta, como análisis exploratorio evaluamos la aparición de la misma en nuestra muestra. Una limitación de nuestro estudio es que su medición no se hizo de manera sistemática. No se especificó el momento en el que se desarrolló la HTA ni el grado de la misma. Para el análisis solo se consideraron a aquéllos que no tenían HTA de forma previa al tratamiento y sí durante el tratamiento antiangiogénico. Con un número limitado de pacientes (un total de 28 pacientes, 12.3% de la muestra), no vimos diferencias entre la aparición de HTA y la TRG, pero, en los pacientes con cáncer colorrectal, observamos un aumento de SG en los 15 pacientes que presentaron HTA durante el tratamiento con bevacizumab ($p=0.04$). Por otro lado, las 13 pacientes con cáncer de mama que desarrollaron HTA durante el tratamiento con bevacizumab, tardaron más en fracasar al tratamiento de forma estadísticamente significativa ($p=0.009$), sin encontrar diferencias significativas en SG ($p=0.46$). La literatura al respecto es controvertida, lo cual podría deberse a una recogida deficiente del evento HTA. Ello es lo que ha motivado la realización del estudio BRECOL; un estudio observacional y prospectivo que evalúa la HTA (diagnosticada de forma óptima mediante monitorización por Holter durante 24 horas de forma basal, dentro de los 14 días antes del inicio del tratamiento así como el primer día de los ciclos 1, 2 y 3) como predictor de eficacia de bevacizumab en términos de SLP en pacientes con cáncer de mama y colorrectal avanzado en tratamiento de primera línea con QT y bevacizumab, pendiente de resultados²⁵⁹.

Aunque se ha descrito que diferentes polimorfismos de VEGF podrían asociarse con la HTA desarrollada durante el tratamiento antiangiogénico^{105,260}, nosotros no hemos encontrado diferencias.

Reconocemos que el tamaño de la muestra del estudio es relativamente pequeño. Sin embargo, hemos visto que determinados polimorfismos genéticos del SRA, NOS3 y de la vía de VEGF se asocian con el beneficio a bevacizumab en pacientes con cáncer de mama y colorrectal avanzado, lo que sugiere la hipótesis de que el efecto de las variaciones genéticas del SRA, del gen NOS3 y de la vía VEGF pueden ser de gran magnitud puesto que un número limitado de pacientes ha sido suficiente para encontrar diferencias estadísticamente significativas, si bien es cierto que nuestros resultados son generadores de hipótesis, siendo necesarios más estudios que determinen su papel exacto en la respuesta tumoral a la terapia antiangiogénica.

7.CONCLUSIONES

Nuestro trabajo es un estudio piloto que pretendía explorar si existe vinculación entre el SRA-HTA y cáncer.

En cáncer de mama avanzado:

- El genotipo IN/IN del polimorfismo ECA I/D (rs1799752 o rs4646994) se asoció con una tasa de progresión mayor y con un TFT menor en comparación con IN/DEL y DEL/DEL.
- El genotipo CT del polimorfismo AGT M235T (rs699) se relacionó con un TFT y SG menores en comparación con TT y CC.
- El genotipo CC de VEGFR-1 o FLT se vinculó con una SG menor en comparación con AA y CA.
- El genotipo CT de NOS3 786T>C (rs2070744) se asoció con una SG menor en comparación con TT y CC.
- Niveles plasmáticos de VEGF-A superiores se correlacionaron con una TRG mayor y con una disminución del riesgo de fallar al tratamiento.

En cáncer colorrectal avanzado:

- El genotipo AA del polimorfismo VEGF -2578 C/A (rs699947) se asoció con más progresiones, así como con un TFT y una SG menores en comparación con CC y AC.
- El genotipo GT del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) se vinculó con una tasa de progresión mayor y con una SG menor en comparación con GG y TT.
- El genotipo AA del polimorfismo AGTR1 A1166C (rs5186) se relacionó con una tasa de progresión mayor en comparación con AC y CC.

Considerando la muestra en su totalidad:

- El genotipo DEL/DEL se asoció con niveles superiores de ECA en plasma pero sin alcanzar la significación estadística. Además niveles altos de ECA se correlacionaron con más TRG.
- Pacientes con niveles de ECA ≥ 135 ng/mL y genotipos DEL/DEL o IN/DEL presentaron un TFT mayor que aquéllos con niveles de ECA < 135 ng/mL y genotipo IN/IN.

8.ABREVIATURAS

AGT: angiotensinógeno
AGTR-1: receptor de angiotensina II tipo 1
AGTR-2: receptor de angiotensina II tipo 2
ASCO: American Society of Clinical Oncology (Sociedad Americana de Oncología Clínica)
AT: angiotensina
AT-I: angiotensina I
AT-II: angiotensina II
CCRM: cáncer colorrectal metastásico
CEA: antígeno carcinoembrionario
CMm: cáncer de mama metastásico
CSF: Colony Stimulating Factor (factor estimulante de colonias)
ECA: enzima convertidora de angiotensina
EE: enfermedad estable
EGF: Epidermal Growth Factor (factor de crecimiento epidérmico)
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (receptor del factor epidérmico de crecimiento)
eNOS o NOS3: endothelial Nitric Oxide Synthase (óxido nítrico sintasa endotelial)
EMA: European Medicines Agency (Agencia Europea de Medicamentos)
ESMO: European Society for Medical Oncology (Sociedad Europea de Oncología Médica)
ET-1: endotelina 1
FGF Fibroblast Growth Factor (factor de crecimiento de fibroblastos)
FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos)
FGFb: basic Fibroblast Growth Factor (factor de crecimiento de fibroblastos básico)
FDA: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
HER2: Human Epidermal growth factor receptor 2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)
HT: hormonoterapia
IGF-1: Insuline-like Growth Factor (factor de crecimiento similar a la insulina)
HTA: hipertensión arterial
NO: óxido nítrico
NV: no valorable

PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptors (factor de crecimiento derivado de plaquetas)

PET: tomografía por emisión de positrones

PE: progresión de enfermedad

PIGF: Placental Growth Factor (factor de crecimiento plaquetario)

QT: quimioterapia

RAS WT: RAS wild type

RC: respuesta completa

RE: receptor de estrógenos

RG: respuestas globales

RH: receptor hormonal

RM: resonancia magnética

RP: Respuesta parcial

RProg: receptor de progesterona

SG: supervivencia global

SLE: supervivencia libre de enfermedad

SLP: supervivencia libre de progresión

TA: tensión arterial

TC: tomografía computarizada

TNF: Tumor Necrosis Factor (factor de necrosis tumoral).

TFT: tiempo al fallo de tratamiento

TR: tasa de respuestas

TRG: tasa de respuestas globales

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (factor de crecimiento endotelial vascular)

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular)

9.BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015;136(5):E386.
2. Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2016. Disponible en: https://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESP_2016.pdf
3. Jiménez J, Pulido G, Cano MT, Méndez MJ, Gómez MA, Aranda E. Nuevas fronteras en cáncer de colon. Madrid: Elsevier; 2011.
4. Alfonso De Stefano Chiara Carlomagno. Beyond KRAS: Predictive factors of the efficacy of anti-EGFR monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(29):9732-9743.
5. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016;27(8):1386-1422.
6. Aranda E, Aparicio J, Alonso V, Garcia-Albeniz X, Garcia-Alfonso P, Salazar R, et al. SEOM clinical guidelines for diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer 2015. *Clin Transl Oncol* 2015;17(12):972-981.
7. de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homérin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(16):2938-2947.
8. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000;355(9209):1041-1047.
9. Van Cutsem E, Lenz H, Köhne C, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(7):692-700.
10. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zobel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011;22(7):1535-1546.
11. Douillard J, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013;369(11):1023-1034.
12. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350(23):2335-2342.
13. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figuer A, Wong R, 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(12):2013-2019.
14. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon J, Hecht JR, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously

untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(21):2240-2247.

15. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S, 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(10):1065-1075.

16. Stintzing S, Modest DP, Rossius L, Lerch MM, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016;17(10):1426-1434.

17. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz H, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, et al. Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2017;317(23):2392-2401.

18. Khattak MA, Martin H, Davidson A, Phillips M. Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Colorectal Cancer* 2015;14(2):81-90.

19. Venook AP, Niedzwiecki D, Innocenti F, Fruth B, Greene C, O'Neil BH, et al. Impact of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *JCO* 2016;34(15_suppl):3504-3504.

20. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJM, Schrama JG, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360(6):563-572.

21. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, et al. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(5):672-680.

22. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *The Lancet Oncology* 2015;16(13):1306-1315.

23. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1670-1676.

24. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocvirk J, Shin DB, 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(11):1077-1085.

25. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005;23(16):3697-3705.

26. Sastre J, Massuti B, Pulido G, Guillén-Ponce C, Benavides M, Manzano JL, et al. First-line single-agent panitumumab in frail elderly patients with wild-type KRAS metastatic colorectal cancer and poor prognostic factors: A phase II study of the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumours. *Eur J Cancer* 2015;51(11):1371-1380.
27. Sastre J, Aranda E, Grávalos C, Massutí B, Varella-Garcia M, Rivera F, et al. First-line single-agent cetuximab in elderly patients with metastatic colorectal cancer. A phase II clinical and molecular study of the Spanish group for digestive tumor therapy (TTD). *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;77(1):78-84.
28. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Österlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14(1):29-37.
29. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. 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(12):1539-1544.
30. Van Cutsem E, Taberero J, Lakomy R, Prenen H, Prausová J, Macarulla T, 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(28):3499-3506.
31. Taberero J, Yoshino T, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015;16(5):499-508.
32. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(31):4706-4713.
33. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351(4):337-345.
34. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1658-1664.
35. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au H, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007;357(20):2040-2048.
36. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;381(9863):303-312.
37. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2015;372(20):1909-1919.

38. Taube JM, Galon J, Sholl LM, Rodig SJ, Cottrell TR, Giraldo NA, et al. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod Pathol* 2018;31(2):214-234.
39. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509-2520.
40. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26 Suppl 5:8.
41. GEICAM (Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama). Guía completa para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama metastásico; Madrid: Comuniland S.L.; 2015. Disponible en: <https://www.geicam.org/wp-content/uploads/2016/06/GUIA-GEICAM-COMPLETA.pdf>
42. Cardoso F, Costa A, Senkus E, Aapro M, André F, Barrios CH, et al. 3rd ESO-ESMO international consensus guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Breast* 2017;31:244-259.
43. Gavilá J, Lopez-Tarruella S, Saura C, Muñoz M, Oliveira M, De la Cruz-Merino L, et al. SEOM clinical guidelines in metastatic breast cancer 2015. *Clin Transl Oncol* 2015;17(12):946-955.
44. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-752.
45. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R. NCCN guidelines Breast cancer version 4.2017-February 7, 2018.
46. Sociedad Española de Oncología Médica, (SEOM). Informe de evaluación de fármacos. (Ibrance®) en el tratamiento del cáncer de mama metastásico o localmente avanzado con expresión de receptores hormonales y HER2 negativo; 2016. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/Informes_SEOM/IPT_Palbociclib.pdf
47. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;366(6):520-529.
48. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im S, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2016;375(20):1925-1936.
49. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im S, Masuda N, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2016;17(4):425-439.
50. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357(26):2666-2676.
51. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortés J, Pivot X, Tomczak P, et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(20):3239-3247.

52. Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1252-1260.
53. Brufsky AM, Hurvitz S, Perez E, Swamy R, Valero V, O'Neill V, et al. RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(32):4286-4293.
54. Gianni L, Romieu GH, Lichinitser M, Serrano SV, Mansutti M, Pivot X, et al. AVEREL: a randomized phase III Trial evaluating bevacizumab in combination with docetaxel and trastuzumab as first-line therapy for HER2-positive locally recurrent/metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(14):1719-1725.
55. Martín M, Loibl S, von Minckwitz G, Morales S, Martinez N, Guerrero A, et al. Phase III trial evaluating the addition of bevacizumab to endocrine therapy as first-line treatment for advanced breast cancer: the letrozole/fulvestrant and avastin (LEA) study. *J Clin Oncol* 2015;33(9):1045-1052.
56. Dickler MN, Barry WT, Cirincione CT, Ellis MJ, Moynahan ME, Innocenti F, et al. Phase III Trial Evaluating Letrozole As First-Line Endocrine Therapy With or Without Bevacizumab for the Treatment of Postmenopausal Women With Hormone Receptor-Positive Advanced-Stage Breast Cancer: CALGB 40503 (Alliance). *J Clin Oncol* 2016;34(22):2602-2609.
57. Swain SM, Baselga J, Kim S, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2015;372(8):724-734.
58. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;367(19):1783-1791.
59. Schwartzberg LS, Schwarzbach LS, Franco SX, Florance A, O'Rourke L, Maltzman J, et al. Lapatinib plus letrozole as first-line therapy for HER-2+ hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Oncologist* 2010;15(2):122-129.
60. Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, Bapsy PP, Vaid A, Wardley A, et al. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAndEM study. *J Clin Oncol* 2009;27(33):5529-5537.
61. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-1186.
62. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 2014;17(3):471-494.
63. Robinson ES, Khankin EV, Karumanchi SA, Humphreys BD. Hypertension induced by vascular endothelial growth factor signaling pathway inhibition: mechanisms and potential use as a biomarker. *Semin Nephrol* 2010;30(6):591-601.
64. Horsley L, Marti K, Jayson GC. Is the toxicity of anti-angiogenic drugs predictive of outcome? A review of hypertension and proteinuria as biomarkers of response to anti-angiogenic therapy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8(3):283-293.

65. Bhargava P. VEGF kinase inhibitors: how do they cause hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297(1):1.
66. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull* 2011;34(12):1785-1788.
67. Lankhorst S, Saleh L, Danser AJ, van den Meiracker, Anton H. Etiology of angiogenesis inhibition-related hypertension. *Curr Opin Pharmacol* 2015;21:7-13.
68. Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell* 2014;26(5):605-622.
69. Pories SE, Wulf GM. Evidence for the role of bevacizumab in the treatment of advanced metastatic breast cancer: a review. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2010;2:37-44.
70. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355(24):2542-2550.
71. Tewari KS, Sill MW, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, Landrum LM, et al. Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240). *Lancet* 2017.
72. Kelly WK, Halabi S, Carducci M, George D, Mahoney JF, Stadler WM, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial comparing docetaxel and prednisone with or without bevacizumab in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: CALGB 90401. *J Clin Oncol* 2012;30(13):1534-1540.
73. Rossi L, Verrico M, Zaccarelli E, Papa A, Colonna M, Strudel M, et al. Bevacizumab in ovarian cancer: A critical review of phase III studies. *Oncotarget* 2017;8(7):12389-12405.
74. Escudier B, Bellmunt J, Négrier S, Bajetta E, Melichar B, Bracarda S, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol* 2010;28(13):2144-2150.
75. Tamura R, Tanaka T, Miyake K, Yoshida K, Sasaki H. Bevacizumab for malignant gliomas: current indications, mechanisms of action and resistance, and markers of response. *Brain Tumor Pathol* 2017;34(2):62-77.
76. Ohtsu A, Shah MA, Van Cutsem E, Rha SY, Sawaki A, Park SR, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *J Clin Oncol* 2011;29(30):3968-3976.
77. Kim KB, Sosman JA, Fruehauf JP, Linette GP, Markovic SN, McDermott DF, et al. BEAM: a randomized phase II study evaluating the activity of bevacizumab in combination with carboplatin plus paclitaxel in patients with previously untreated advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2012;30(1):34-41.
78. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 2010;28(22):3617-3622.

79. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica bevacizumab. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000582/WC500029271.pdf
80. Ranpura V, Pulipati B, Chu D, Zhu X, Wu S. Increased risk of high-grade hypertension with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *Am J Hypertens* 2010;23(5):460-468.
81. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* 2004;7(4):335-345.
82. Facemire CS, Nixon AB, Griffiths R, Hurwitz H, Coffman TM. Vascular endothelial growth factor receptor 2 controls blood pressure by regulating nitric oxide synthase expression. *Hypertension* 2009;54(3):652-658.
83. Pande A, Lombardo J, Spangenthal E, Javle M. Hypertension secondary to anti-angiogenic therapy: experience with bevacizumab. *Anticancer Res* 2007;27(5B):3465-3470.
84. Neagoe P, Lemieux C, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem* 2005;280(11):9904-9912.
85. Kappers MHW, van Esch, Joep H M, Sluiter W, Sleijfer S, Danser AHJ, van den Meiracker, Anton H. Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels. *Hypertension* 2010;56(4):675-681.
86. de Jesus-Gonzalez N, Robinson E, Moslehi J, Humphreys B. Management of Antiangiogenic Therapy-Induced Hypertension. *Hypertension* 2012;60(3):607-615.
87. Steeghs N, Gelderblom H, Roodt JO', Christensen O, Rajagopalan P, Hovens M, et al. Hypertension and rarefaction during treatment with telatinib, a small molecule angiogenesis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2008;14(11):3470-3476.
88. Belcik JT, Qi Y, Kaufmann BA, Xie A, Bullens S, Morgan TK, et al. Cardiovascular and systemic microvascular effects of anti-vascular endothelial growth factor therapy for cancer. *J Am Coll Cardiol* 2012;60(7):618-625.
89. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999;274(35):25130-25135.
90. Veronese ML, Mosenkis A, Flaherty KT, Gallagher M, Stevenson JP, Townsend RR, et al. Mechanisms of hypertension associated with BAY 43-9006. *J Clin Oncol* 2006;24(9):1363-1369.
91. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med* 2009;15(5):545-552.
92. González-Pacheco FR, Deudero JJP, Castellanos MC, Castilla MA, Alvarez-Arroyo MV, Yagüe S, et al. Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: protective role of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H₂O₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(3):1395.

93. Scartozzi M, Galizia E, Chiorrini S, Giampieri R, Berardi R, Pierantoni C, et al. Arterial hypertension correlates with clinical outcome in colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab. *Ann Oncol* 2009;20(2):227-230.
94. Ryanne Wu R, Lindenberg PA, Slack R, Noone A, Marshall JL, He AR. Evaluation of hypertension as a marker of bevacizumab efficacy. *J Gastrointest Cancer* 2009;40(3-4):101-108.
95. Burnette BL, Grothey A. Hypertension and survival in unresectable metastatic colorectal cancer (mCRC) patients receiving first-line bevacizumab (BEV) and FOLFOX. *JCO* 2010;28(15_suppl):e14066.
96. Österlund P, Soveri L-, Isoniemi H, Poussa T, Alanko T, Bono P. Hypertension and overall survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing chemotherapy. *Br J Cancer* 2011;104(4):599-604.
97. De Stefano A, Carlomagno C, Pepe S, Bianco R, De Placido S. Bevacizumab-related arterial hypertension as a predictive marker in metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68(5):1207-1213.
98. Tahover E, Uziely B, Salah A, Temper M, Peretz T, Hubert A. Hypertension as a predictive biomarker in bevacizumab treatment for colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2013;30(1):327.
99. Khoja L, Kumaran G, Zee YK, Murukesh N, Swindell R, Saunders MP, et al. Evaluation of hypertension and proteinuria as markers of efficacy in antiangiogenic therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol* 2014;48(5):430-434.
100. Cai J, Ma H, Huang F, Zhu D, Bi J, Ke Y, 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.
101. Feliu J, Salud A, Safont MJ, García-Girón C, Aparicio J, Losa F, et al. Correlation of hypertension and proteinuria with outcome in elderly bevacizumab-treated patients with metastatic colorectal cancer. *PLoS ONE* 2015;10(1):e0116527.
102. Dionísio de Sousa, Isabel José, Ferreira J, Rodrigues J, Bonito N, Jacinto P, Marques M, et al. Association between bevacizumab-related hypertension and response to treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *ESMO Open* 2016;1(3):e000045.
103. Kanai M, Ishiguro H, Mori Y, Kitano T, Nishimura T, Matsumoto S, et al. Temporary blood pressure drop after bevacizumab administration is associated with clinical course of advanced colorectal cancer. *British journal of cancer* 2011;105(11):1693-1696.
104. Dewdney A, Cunningham D, Barbachano Y, Chau I. Correlation of bevacizumab-induced hypertension and outcome in the BOXER study, a phase II study of capecitabine, oxaliplatin (CAPOX) plus bevacizumab as peri-operative treatment in 45 patients with poor-risk colorectal liver-only metastases unsuitable for upfront resection. *Br J Cancer* 2012;106(11):1718-1721.
105. Schneider BP, Wang M, Radovich M, Sledge GW, Badve S, Thor A, et al. Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4672-4678.
106. Gampenrieder SP, Romeder F, Muß C, Pircher M, Ressler S, Rinnerthaler G, et al. Hypertension as a predictive marker for bevacizumab in metastatic breast cancer: results from a retrospective matched-pair analysis. *Anticancer Res* 2014;34(1):227-233.

107. Lombardi G, Zustovich F, Farina P, Fiduccia P, Della Puppa A, Polo V, et al. Hypertension as a biomarker in patients with recurrent glioblastoma treated with antiangiogenic drugs: a single-center experience and a critical review of the literature. *Anticancer Drugs* 2013;24(1):90-97.
108. Rini BI, Cohen DP, Lu DR, Chen I, Hariharan S, Gore ME, et al. Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(9):763-773.
109. Dahlberg SE, Sandler AB, Brahmer JR, Schiller JH, Johnson DH. Clinical course of advanced non-small-cell lung cancer patients experiencing hypertension during treatment with bevacizumab in combination with carboplatin and paclitaxel on ECOG 4599. *J Clin Oncol* 2010;28(6):949-954.
110. Smith I, Pierga J, Biganzoli L, Cortes-Funes H, Thomssen C, Saracchini S, et al. Final overall survival results and effect of prolonged (≥ 1 year) first-line bevacizumab-containing therapy for metastatic breast cancer in the ATHENA trial. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130(1):133-143.
111. Hurwitz HI, Douglas PS, Middleton JP, Sledge GW, Johnson DH, Reardon DA, et al. Analysis of early hypertension and clinical outcome with bevacizumab: results from seven phase III studies. *Oncologist* 2013;18(3):273-280.
112. Angelucci A, Delle Monache S, Cortellini A, Di Padova M, Ficorella C. "Vessels in the Storm": Searching for Prognostic and Predictive Angiogenic Factors in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19(1).
113. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2009;8(9):2496-2508.
114. Beştaş R, Kaplan MA, Işıkdoğan A. The correlation between serum VEGF levels and known prognostic risk factors in colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2014;61(130):267-271.
115. Divella R, Daniele A, DE Luca R, Simone M, Naglieri E, Savino E, et al. Circulating Levels of VEGF and CXCL1 Are Predictive of Metastatic Organotropism in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2017;37(9):4867-4871.
116. Kwon KA, Kim SH, Oh SY, Lee S, Han J, Kim KH, et al. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor, interleukin-6, and C-reactive protein level in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010;10:203.
117. Schmoll H, Hoff PM, Robertson JD, Pike L, Morgan S, Wilson D, et al. Association of baseline CEA, VEGF, and soluble VEGF receptor-2 with treatment outcomes in two randomized phase III trials of cediranib in metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(15_suppl):3590.
118. Hegde PS, Jubb AM, Chen D, Li NF, Meng YG, Bernaards C, et al. Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2013;19(4):929-937.
119. Tabernero J, Paccard C, Chiron M, Dochy E, Van Cutsem E. Placental growth factor and the angiogenic environment based on analysis of baseline plasma biomarkers from the VELOUR trial. *JCO* 2017;35(4_suppl):592-592.

120. Keskin M, Ustuner Z, Dincer M, Etiz D, Celik HE, Gulbas Z. Importance of Serum VEGF and Basic FGF Levels in Determining Response to Treatment And Survival in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Hematology and Oncology* 2015;24-31.
121. Marisi G, Scarpi E, Passardi A, Nanni O, Ragazzini A, Valgiusti M, et al. Circulating VEGF and eNOS variations as predictors of outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving bevacizumab. *Sci Rep* 2017;7(1):1293.
122. Salven P, Mänpää H, Orpana A, Alitalo K, Joensuu H. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3(5):647-651.
123. Hodorowicz-Zaniewska D, Kibil W, Małek A, Szpor J, Kulig J, Sztéfko K. Evaluation of serum concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer patients. *Pol J Pathol* 2012;63(4):255-260.
124. Burstein HJ, Chen Y, Parker LM, Savoie J, Younger J, Kuter I, et al. VEGF as a marker for outcome among advanced breast cancer patients receiving anti-VEGF therapy with bevacizumab and vinorelbine chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(23):7871-7877.
125. Lissoni P, Fugamalli E, Malugani F, Ardizzioia A, Secondino S, Tancini G, et al. Chemotherapy and angiogenesis in advanced cancer: vascular endothelial growth factor (VEGF) decline as predictor of disease control during taxol therapy in metastatic breast cancer. *Int J Biol Markers* 2000;15(4):308-311.
126. Tang J, Zhao J, Lu J, Yan F, Qin J, Xu B. Circulating levels of angiogenic cytokines in advanced breast cancer patients with system chemotherapy and their potential value in monitoring disease course. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(1):55-63.
127. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, 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(3):453-459.
128. Colleoni M, Rocca A, Sandri MT, Zorzino L, Masci G, Nolè F, et al. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Ann Oncol* 2002;13(1):73-80.
129. Im S, Kim S, Lee MH, Im Y, Lee KH, Song H, et al. Docetaxel plus epirubicin as first-line chemotherapy in MBC (KCSG 01-10-05): phase II trial and the predictive values of circulating HER2 extracellular domain and vascular endothelial growth factor. *Oncol Rep* 2005;14(2):481-487.
130. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, Boucher Y, Ancukiewicz M, Sahani DV, 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(18):3020-3026.
131. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349(5):427-434.
132. Loupakis F, Falcone A, Masi G, Fioravanti A, Kerbel RS, Del Tacca M, et al. Vascular endothelial growth factor levels in immunodepleted plasma of cancer patients as a possible pharmacodynamic marker for bevacizumab activity. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1816-1818.

133. Brostjan C, Gebhardt K, Gruenberger B, Steinrueck V, Zommer H, Freudenthaler H, et al. Neoadjuvant treatment of colorectal cancer with bevacizumab: the perioperative angiogenic balance is sensitive to systemic thrombospondin-1 levels. *Clin Cancer Res* 2008;14(7):2065-2074.
134. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Sledge GW, Holmgren E, Benjamin R, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(3):843-850.
135. F Loupakis, C Cremolini, A Fioravanti, P Orlandi, L Salvatore, G Masi, et al. Pharmacodynamic and pharmacogenetic angiogenesis-related markers of first-line FOLFOXIRI plus bevacizumab schedule in metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2011;104(8):1262-1269.
136. Hayashi H, Arao T, Matsumoto K, Kimura H, Togashi Y, Hirashima Y, et al. Biomarkers of reactive resistance and early disease progression during chemotherapy plus bevacizumab treatment for colorectal carcinoma. *Oncotarget* 2014;5(9):2588-2595.
137. Azzariti A, Porcelli L, Brunetti O, Del Re M, Longo V, Nardulli P, et al. Total and not bevacizumab-bound vascular endothelial growth factor as potential predictive factors to bevacizumab-based chemotherapy in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22(27):6287-6295.
138. Pectasides D, Papaxoinis G, Kalogeras KT, Eleftheraki AG, Xanthakis I, Makatsoris T, et al. XELIRI-bevacizumab versus FOLFIRI-bevacizumab as first-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group phase III trial with collateral biomarker analysis. *BMC Cancer* 2012;12:271.
139. Miles D, Cameron D, Bondarenko I, Manzyuk L, Alcedo JC, Lopez RI, et al. Bevacizumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for HER2-negative metastatic breast cancer (MERiDiAN): A double-blind placebo-controlled randomised phase III trial with prospective biomarker evaluation. *Eur J Cancer* 2017;70:146-155.
140. Raby BA, Blank RD. Genetics: Glossary of terms. Mar 2018. Uptodate. Disponible en: <http://www.uptodate.com>
141. Custodio A, Barriuso J, de Castro J, Martínez-Marín V, Moreno V, Rodríguez-Salas N, et al. Molecular markers to predict outcome to antiangiogenic therapies in colorectal cancer: current evidence and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 2013;39(8):908-924.
142. Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L, Cremolini C, Masi G, Frumento P, et al. Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011;11:247.
143. Loupakis F, Cremolini C, Yang D, Salvatore L, Zhang W, Wakatsuki T, 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(7):e66774.
144. Sohn BS, Park SJ, Kim JE, Kim K, Hong YS, Suh C, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor pathway and outcomes of patients treated with first-line cytotoxic chemotherapy combined with bevacizumab for advanced colorectal cancer. *Oncology* 2014;87(5):280-292.
145. Formica V, Palmirotta R, Del Monte G, Savonarola A, Ludovici G, De Marchis ML, et al. Predictive value of VEGF gene polymorphisms for metastatic colorectal cancer patients receiving

- first-line treatment including fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab. *Int J Colorectal Dis* 2011;26(2):143-151.
146. Koutras AK, Antonacopoulou AG, Eleftheraki AG, Dimitrakopoulos F-, Koumarianou A, Varthalitis I, 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(6):468-475.
147. Etienne-Grimaldi M, Formento P, Degeorges A, Pierga J, Delva R, Pivot X, et al. Prospective analysis of the impact of VEGF-A gene polymorphisms on the pharmacodynamics of bevacizumab-based therapy in metastatic breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2011;71(6):921-928.
148. Sibertin-Blanc C, Mancini J, Fabre A, Lagarde A, Del Grande J, Levy N, et al. Vascular Endothelial Growth Factor A c.*237C>T polymorphism is associated with bevacizumab efficacy and related hypertension in metastatic colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2015;47(4):331-337.
149. Hansen TF, Christensen Rd, Andersen RF, Garm Spindler K, Johnsson A, Jakobsen A. 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(6):715-720.
150. Cremolini C, Loupakis F, Yang D, Salvatore L, Zhang W, Wakatsuki T, et al. Prospective evaluation of candidate SNPs of VEGF/VEGFR pathway in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients (pts) treated with first-line FOLFIRI plus bevacizumab (BV). *JCO* 2012;30(15_suppl):3518-3518.
151. Murphy JE, Liebman HM, Zhou Q, Bote JT, Daskalova A, Hooshmand SM, et al. Functional SNPs in vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and overall survival (OS) in bevacizumab-treated patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *JCO* 2012 May 20;30(15_suppl):3594-3594.
152. Lambrechts D, Delmar P, Miles DW, Leighl N, Saltz L, Escudier B, et al. Single Nucleotide Polymorphism Analysis and Outcome in Advanced-stage Cancer Patients Treated With Bevacizumab. *European Journal of Cancer* 2011;47:S173.
153. Pander J, Wessels JaM, Gelderblom H, van der Straaten T, Punt CJA, Guchelaar H-. Pharmacogenetic interaction analysis for the efficacy of systemic treatment in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2011;22(5):1147-1153.
154. van Thiel BS, van der Pluijm I, te Riet L, Essers J, Danser AHJ. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol* 2015;763(Pt A):3-14.
155. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirotsoy M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* 2014;4(3):1201-1228.
156. Bernstein KE, Ong FS, Blackwell WB, Shah KH, Giani JF, Gonzalez-Villalobos RA, et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol Rev* 2013;65(1):1-46.
157. Kotchen TA. Vasculopatía Hipertensiva. *Harrison Principios de Medicina Interna Volumen 2 México: McGrawhill; 2015. p. 1611-1627.*
158. Ager EI, Neo J, Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis* 2008;29(9):1675-1684.

159. Benndorf R, Böger RH, Ergün S, Steenpass A, Wieland T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ Res* 2003;93(5):438-447.
160. Sugimoto M, Yamaoka Y, Shirai N, Furuta T. Role of renin-angiotensin system in gastric oncogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27(3):442-451.
161. Paepe BD, Verstraeten VL, Potter CRD, Bullock GR. Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol* 2002;117(1):13-19.
162. M Tahmasebi, S Barker, J R Puddefoot, G P Vinson. Localisation of renin-angiotensin system (RAS) components in breast. *British Journal of Cancer* 2006;95(1):67-74.
163. Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, et al. Functional Expression of the Angiotensin II Type1 Receptor in Human Ovarian Carcinoma Cells and Its Blockade Therapy Resulting in Suppression of Tumor Invasion, Angiogenesis, and Peritoneal Dissemination. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2686-2694.
164. O Arrieta, B Pineda-olvera, P Guevara-salazar, N Hernández-pedro, D Morales-espinosa, T L Cerón-lizarraga, et al. Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *British Journal of Cancer* 2008;99(1):160-166.
165. Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC cancer* 2010;10(1):134.
166. Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280(4):R1000.
167. Okwan-Duodu D, Landry J, Shen XZ, Diaz R. Angiotensin-converting enzyme and the tumor microenvironment: mechanisms beyond angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013;305(3):205.
168. Menter AR, Carroll NM, Sakoda LC, Delate T, Hornbrook MC, Jain RK, et al. Effect of Angiotensin System Inhibitors on Survival in Patients Receiving Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 2017;18(2):197.e3.
169. Nakai Y, Isayama H, Ijichi H, Sasaki T, Sasahira N, Hirano K, et al. Inhibition of renin-angiotensin system affects prognosis of advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine. *Br J Cancer* 2010;103(11):1644-1648.
170. Kim ST, Park KH, Oh SC, Seo JH, Kim JS, Shin SW, et al. How does inhibition of the renin-angiotensin system affect the prognosis of advanced gastric cancer patients receiving platinum-based chemotherapy? *Oncology* 2012;83(6):354-360.
171. Keizman D, Huang P, Eisenberger MA, Pili R, Kim JJ, Antonarakis ES, et al. Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: A retrospective examination. *European Journal of Cancer* 2011;47(13):1955-1961.
172. Sun H, Li T, Zhuang R, Cai W, Zheng Y. Do renin-angiotensin system inhibitors influence the recurrence, metastasis, and survival in cancer patients?: Evidence from a meta-analysis including 55 studies. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(13):e6394.

173. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, et al. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998;352(9123):179-184.
174. Coleman CI, Baker WL, Kluger J, White CM. Antihypertensive medication and their impact on cancer incidence: a mixed treatment comparison meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens* 2008;26(4):622-629.
175. Sipahi I, Debanne SM, Rowland DY, Simon DI, Fang JC. Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2010;11(7):627-636.
176. Shen J, Huang Y, Wang M, Hong X, Song X, Zou X, et al. Renin-angiotensin system blockade for the risk of cancer and death. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2016;17(3).
177. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86(4):1343-1346.
178. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (ACE1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992;20:1433-1433.
179. Koh W, Yuan J, Sun C, van den Berg D, Seow A, Lee H, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Res* 2003;63(3):573-578.
180. Alves Corrêa SA, Ribeiro de Noronha, Samuel Marcos, Nogueira-de-Souza NC, Valleta de Carvalho C, Massad Costa AM, Juvenal Linhares J, et al. Association between the angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and angiotensin II type 1 receptor (A1166C) polymorphisms and breast cancer among Brazilian women. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2009;10(1):51-58.
181. Ebert MPA, Lendeckel U, Westphal S, Dierkes J, Glas J, Folwaczny C, et al. The Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism Is Linked to Early Gastric Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(12):2987-2989.
182. van der Knaap R, Siemes C, Coebergh JW, van Duijn CM, Hofman A, Stricker BHC. Renin-angiotensin system inhibitors, angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, and cancer: the Rotterdam Study. *Cancer* 2008;112(4):748-757.
183. Fishchuk LE, Gorovenko NG. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in breast cancer patients. *Exp Oncol* 2013;35(2):101-104.
184. Haiman CA, Henderson SO, Bretsky P, Kolonel LN, Henderson BE. Genetic variation in angiotensin I-converting enzyme (ACE) and breast cancer risk: the multiethnic cohort. *Cancer Res* 2003;63(20):6984-6987.
185. Freitas-Silva M, Pereira D, Coelho C, Bicho M, Lopes C, Medeiros R. Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and endometrial human cancer in normotensive and hypertensive women. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;155(1):42-46.
186. Hibi S, Goto Y, Ando T, Matsuo K, Wakai K, Tajima K, et al. No association between angiotensin I converting enzyme (ACE) I/D polymorphism and gastric cancer risk among Japanese. *Nagoya J Med Sci* 2011;73(3-4):169-175.

187. Xi B, Zeng T, Liu L, Liang Y, Liu W, Hu Y, et al. Association between polymorphisms of the renin-angiotensin system genes and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130(2):561-568.
188. Ruiter R, Visser LE, Van Duijn CM, Stricker BHC. The ACE insertion/deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11(4):421-430.
189. Yang H, Cai C, Ye L, Rao Y, Wang Q, Hu D, et al. The relationship between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and digestive cancer risk: Insights from a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015;16(4):1306-1313.
190. Niu W, Qi Y. Association of the angiotensin II type I receptor gene +1166 A>C polymorphism with hypertension risk: evidence from a meta-analysis of 16474 subjects. *Hypertens Res* 2010;33(11):1137-1143.
191. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Féry I, Charru A, Clauser E, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994;24(1):63-69.
192. Chen F, Chen G, Dou Y, Xu X. Association of angiotensin II type 1 receptor (A1166C) polymorphism with breast cancer risk: An update meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015;16(4):851-857.
193. Li L, Wang F, Lv PW, Zhu MZ, He JJ, Guo GC, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism and breast cancer susceptibility. *Genet Mol Res* 2015;14(4):15016-15023.
194. Deckers IA, van den Brandt, Piet A, van Engeland M, van Schooten F, Godschalk RW, Keszei AP, et al. Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid. *Int J Cancer* 2015;136(5):1104-1116.
195. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;71(1):169-180.
196. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997;30(6):1331-1337.
197. González-Zuloeta Ladd AM, Arias Vásquez A, Siemes C, Yazdanpanah M, Coebergh JW, Hofman A, et al. Differential roles of Angiotensinogen and Angiotensin Receptor type 1 polymorphisms in breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2007;101(3):299-304.
198. Mendizábal-Ruiz AP, Morales J, Castro Martinez X, Gutierrez Rubio SA, Valdez L, Vásquez-Camacho JG, et al. RAS polymorphisms in cancerous and benign breast tissue. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011;12(2):85-92.
199. Lin J, Chen J, Liu C. AGT M235T variant is not associated with risk of cancer. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015;16(2):448-452.
200. Coelho M, Soares-Silva C, Brandão D, Marino F, Cosentino M, Ribeiro L. β -Adrenergic modulation of cancer cell proliferation: available evidence and clinical perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143(2):275-291.

201. Krizanova O, Babula P, Pacak K. Stress, catecholaminergic system and cancer. *Stress* 2016;19(4):419-428.
202. Choi CH, Song T, Kim TH, Choi JK, Park J, Yoon A, et al. Meta-analysis of the effects of beta blocker on survival time in cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140(7):1179-1188.
203. Ahles A, Engelhardt S. Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease. *Pharmacol Rev* 2014;66(3):598-637.
204. Takezaki T, Hamajima N, Matsuo K, Tanaka R, Hirai T, Kato T, et al. Association of polymorphisms in the beta-2 and beta-3 adrenoceptor genes with risk of colorectal cancer in Japanese. *Int J Clin Oncol* 2001;6(3):117-122.
205. Huang XE, Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Mizutani M, Iwata H, et al. Possible association of beta2- and beta3-adrenergic receptor gene polymorphisms with susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001;3(4):264-269.
206. Feigelson HS, Teras LR, Diver WR, Tang W, Patel AV, Stevens VL, et al. Genetic variation in candidate obesity genes ADRB2, ADRB3, GHRL, HSD11B1, IRS1, IRS2, and SHC1 and risk for breast cancer in the Cancer Prevention Study II. *Breast cancer research : BCR* 2008;10(4):R57.
207. Wang H, Hao B, Chen X, Zhao N, Cheng G, Jiang Y, et al. Beta-2 adrenergic receptor gene (ADRB2) polymorphism and risk for lung adenocarcinoma: a case-control study in a Chinese population. *Cancer Lett* 2006;240(2):297-305.
208. Zhang J, Dhakal IB, Zhang X, Prizment AE, Anderson KE. Genetic variability in energy balance and pancreatic cancer risk in a population-based case-control study in Minnesota. *Pancreas* 2014;43(2):281-286.
209. Zheng H, Xu H, Cui B, Xie N, Wang Z, Luo M. Association between polymorphism of the G-protein $\beta 3$ subunit C825T and essential hypertension: an updated meta-analysis involving 36,802 subjects. *Biol Res* 2013;46(3):265-273.
210. Semplicini A, Grandi T, Sandonà C, Cattelan A, Ceolotto G. G-Protein $\beta 3$ -Subunit Gene C825T Polymorphism and Cardiovascular Risk: An Updated Review. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2015;22(3):225-232.
211. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* 2016;575(2 Pt 3):584-599.
212. Hefler LA, Grimm C, Lantzsch T, Lampe D, Koelbl H, Lebrecht A, et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;98(2):151-155.
213. Royo JL, Moreno-Nogueira JA, Galán JJ, González-Martín A, Ruiz A, González-Mancha R, et al. Lack of association between NOS3 Glu298Asp and breast cancer risk: a case-control study. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100(3):331-333.
214. Arıkan S, Cacina C, Guler E, Çulcu S, Tuna G, Yaylım-Eraltan I. The effects of NOS3 Glu298Asp variant on colorectal cancer risk and progression in Turkish population. *Mol Biol Rep* 2012;39(3):3245-3249.

215. Jang MJ, Jeon YJ, Kim JW, Chong SY, Hong SP, Oh D, et al. Association of eNOS polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population. *Gene* 2013;512(2):275-281.
216. Conde MC, Ramirez-Lorca R, Lopez-Jamar JME, Molero E, Ramírez-Armengol JA, Moreno Nogueira JA, et al. Genetic analysis of caveolin-1 and eNOS genes in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2006;16(2):353-359.
217. Zhang L, Chen LM, Wang MN, Chen XJ, Li N, Huang YD, et al. The G894t, T-786c and 4b/a polymorphisms in Enos gene and cancer risk: a meta-analysis. *J Evid Based Med* 2014;7(4):263-269.
218. Cervera Deval J. RECIST y el radiólogo. *Radiología* 2014;56(56):193-205.
219. Nyström F, Karlberg BE, Ohman KP. Serum angiotensin-converting enzyme activity correlates positively with plasma angiotensin II: a population-based study of ambulatory blood pressure and the renin-angiotensin system. *J Hum Hypertens* 1997;11(5):301-306.
220. Pita Fernández S, Pértega Díaz S. Significancia estadística y relevancia clínica. *Cad Aten Primaria* 2001;8:191-195.
221. Pita Fernández S. Determinación del tamaño muestral. *Cad Aten Primaria* 1996;3:138-141.
222. Kim IS, Baek SH. Mouse models for breast cancer metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394(3):443-447.
223. Hannila-Handelberg T, Kontula KK, Paukku K, Lehtonen JY, Virtamo J, Tikkanen I, et al. Common genetic variations of the renin-angiotensin-aldosterone system and response to acute angiotensin I-converting enzyme inhibition in essential hypertension. *J Hypertens* 2010;28(4):771-779.
224. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
225. Tejpar S, Prenen H, Mazzone M. Overcoming Resistance to Antiangiogenic Therapies. *The Oncologist* 2012;17(8):1039-1050.
226. Lambrechts D, Claes B, Delmar P, Reumers J, Mazzone M, Yesilyurt BT, 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(7):724-733.
227. Schneider BP, Radovich M, Miller KD. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Genetic Variability in Cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5297-5302.
228. Schneider BP, Skaar TC, Sledge GW, Badve S, Li L, Flockhart DA. Analysis of angiogenesis genes from paraffin-embedded breast tumor and lymph nodes. *Breast Cancer Res Treat* 2006;96(3):209-215.
229. Coltelli L, Allegrini G, Orlandi P, Giuntini N, Alì G, Fioravanti A, et al. Discordant somatic and germline VEGF-A genotype in a cancer patient resistant to paclitaxel/bevacizumab with chemosensitive hepatic metastasis. *Pharmacogenomics* 2009;10(8):1225-1229.
230. Vinson GP, Barker S, Puddefoot JR. The renin-angiotensin system in the breast and breast cancer. *Endocrine-related cancer* 2012;19(1):R19.

231. Loh M, Koh KX, Yeo BH, Song CM, Chia KS, Zhu F, et al. Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: variability in associations according to race. *Eur J Cancer* 2009;45(14):2562-2568.
232. Ruiters R, Visser LE, Van Duijn CM, Stricker BHC. The ACE insertion/deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11(4):421-430.
233. Namazi S, Monabati A, Ardeshir-Rouhani-Fard S, Azarpira N. Association of angiotensin I converting enzyme (insertion/deletion) and angiotensin II type 1 receptor (A1166C) polymorphisms with breast cancer prognostic factors in Iranian population. *Mol Carcinog* 2010;49(12):1022-1030.
234. Bruno Baudin. New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2002 Mar 1;40(3):256-265.
235. Namazi S, Daneshian A, Mohammadianpanah M, Jafari P, Ardeshir-Rouhani-Fard S, Nasirabadi S. The impact of renin-angiotensin system, angiotensin I converting enzyme (insertion/deletion), and angiotensin II type 1 receptor (A1166C) polymorphisms on breast cancer survival in Iran. *Gene* 2013;532(1):125-131.
236. Yaren A, Turgut S, Kursunluoglu R, Oztop I, Turgut G, Degirmencioglu S, et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene in patients with breast cancer and effects on prognostic factors. *J Investig Med* 2007;55(5):255-261.
237. Röcken C, Lendeckel U, Dierkes J, Westphal S, Carl-McGrath S, Peters B, et al. The Number of Lymph Node Metastases in Gastric Cancer Correlates with the Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2526-2530.
238. Wang X, Wang S, Lin Y, Wu J, Chen H, Mao Y, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of prostate cancer in the Han population of China. *Med Oncol* 2012;29(3):1964-1971.
239. Hamdi HK, Castellon R. A genetic variant of ACE increases cell survival: a new paradigm for biology and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318(1):187-191.
240. Ricciuti B, Foglietta J, Chiari R, Sahebkar A, Banach M, Bianconi V, et al. Emerging enzymatic targets controlling angiogenesis in cancer: preclinical evidence and potential clinical applications. *Med Oncol* 2017;35(1):4.
241. Bar J, Ding K, Zhao H, Han L, Laurie SA, Seymour L, et al. Angiotensin-Converting Enzyme and Aldosterone Serum Levels as Prognostic and Predictive Biomarkers for Cediranib in NCIC Clinical Trials Group Study BR.24. *Clin Lung Cancer* 2015;16(6):189.
242. Haba Jdl, Aguilar EA, Morales S, García-Sáenz JA, Guerrero A, Martínez N, et al. ACE and CXCL10 as predictive biomarkers in the LEA study. *Ann Oncol* 2016;27(suppl_6).
243. Ceolotto G, Papparella I, Bortoluzzi A, Strapazzon G, Ragazzo F, Bratti P, et al. Interplay between miR-155, AT1R A1166C polymorphism, and AT1R expression in young untreated hypertensives. *Am J Hypertens* 2011;24(2):241-246.
244. Egami K. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *Journal of Clinical Investigation* 2003;112(1):67-75.

245. Ghilardi G, Biondi ML, Cecchini F, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. Vascular invasion in human breast cancer is correlated to T-->786C polymorphism of NOS3 gene. *Nitric Oxide* 2003;9(2):118-122.
246. Di Salvatore M, Lo Giudice L, Rossi E, Santonocito C, Nazzicone G, Rodriquenz M, et al. Association of IL-8 and eNOS polymorphisms with clinical outcomes in bevacizumab-treated breast cancer patients: an exploratory analysis. *Clin Transl Oncol* 2016;18(1):40-46.
247. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994;24(1):41-47.
248. Arıkan S, Cacina C, Guler E, Çulcu S, Tuna G, Yaylım-Eraltan I. The effects of NOS3 Glu298Asp variant on colorectal cancer risk and progression in Turkish population. *Mol Biol Rep* 2012;39(3):3245-3249.
249. Yamamori M, Taniguchi M, Maeda S, Nakamura T, Okamura N, Kuwahara A, et al. VEGF T-1498C polymorphism, a predictive marker of differentiation of colorectal adenocarcinomas in Japanese. *Int J Med Sci* 2008;5(2):80-86.
250. Lu H, Shu X, Cui Y, Kataoka N, Wen W, Cai Q, et al. Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival. *Cancer Res* 2005;65(12):5015-5019.
251. Kataoka N, Cai Q, Wen W, Shu X, Jin F, Gao Y, et al. Population-based case-control study of VEGF gene polymorphisms and breast cancer risk among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(6):1148-1152.
252. Jin Q, Hemminki K, Enquist K, Lenner P, Grzybowska E, Klaes R, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11(10):3647-3653.
253. Hofmann G, Langsenlehner U, Renner W, Langsenlehner T, Yazdani-Biuki B, Clar H, et al. Common single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134(5):591-595.
254. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(1):260-264.
255. Yamamori M, Sakaeda T, Nakamura T, Okamura N, Tamura T, Aoyama N, et al. Association of VEGF genotype with mRNA level in colorectal adenocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(1):144-150.
256. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E, et al. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46(3):293-298.
257. Balasubramanian SP, Cox A, Cross SS, Higham SE, Brown NJ, Reed MW. Influence of VEGF-A gene variation and protein levels in breast cancer susceptibility and severity. *International Journal of Cancer* 2007;121(5):1009-1016.
258. Ramaswamy B, Elias AD, Kelbick NT, Dodley A, Morrow M, Hauger M, et al. Phase II trial of bevacizumab in combination with weekly docetaxel in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12(10):3124-3129.

259. Evaluation of Hypertension as a Predictor of Efficacy Bevacizumab in Metastatic Breast Cancer and Metastatic Colorectal Cancer (BRECOL). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01733628?term=brecol&cntry=ES&rank=1>.

260. Li M, Kroetz DL. Bevacizumab-induced hypertension: Clinical presentation and molecular understanding. *Pharmacol Ther* 2018;182:152-160.

261. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene F, Trotti A, (Eds). *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. 2010 Oct 20,.

10.PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS

Genetic variants in the renin–angiotensin system predict response to bevacizumab in cancer patients

Diana Moreno-Muñoz^{*,†,a}, Juan R. de la Haba-Rodríguez^{*,†,a}, Francisco Conde^{*,†}, Laura M. López-Sánchez^{*,†}, Araceli Valverde^{*,†}, Vanessa Hernández^{*,†}, Antonio Martínez^{*,†}, Carlos Villar^{†,§}, Auxiliadora Gómez-España^{*,†}, Ignacio Porras^{*,†}, Antonio Rodríguez-Ariza^{*,†,b} and Enrique Aranda^{*,†,b}

^{*}Oncology Department, Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, University of Córdoba, Córdoba, Spain, [†]Spanish Cancer Network (RTICC), Instituto de Salud Carlos III, Córdoba, Spain, [‡]Clinical Analysis Department, Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, University of Córdoba, Córdoba, Spain, [§]Pathology Department, Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, University of Córdoba, Córdoba, Spain

ABSTRACT

Background Currently, there are no predictive biomarkers for anti-angiogenic strategies in cancer, but response to anti-angiogenic drugs is associated with development of hypertension secondary to treatment. Therefore, this study explored the clinical relevance of genetic polymorphisms in some components of the renin–angiotensin system (RAS).

Material and methods Genomic DNA was isolated from peripheral blood from 95 metastatic breast or colorectal cancer patients treated with bevacizumab, and AGTR1-A1166C (rs5186), AGT-M235T (rs699) SNPs and ACE I/D (rs4646994) polymorphisms were genotyped using RT-PCR. Circulating vascular endothelial growth factor and angiotensin converting enzyme (ACE) levels were analysed using ELISA kits. The antitumoral activity of bevacizumab was assayed in mice orthotopically xenografted with AGTR1-overexpressing breast cancer cells.

Results The ACE IN/IN genotype was associated with a higher rate of disease progression compared to DEL/IN and DEL/DEL genotypes (36% vs. 11.1% $P < 0.05$). Similarly, AGTR1-1166A/A genotype was also associated with a higher rate of disease progression compared to AGTR1-1166A/C and AGTR1-1166C/C genotypes (24.4% vs. 2.7% $P < 0.01$). ACE IN/IN genotype was also found to be associated with shorter time to treatment failure compared to ACE IN/DEL and ACE DEL/DEL genotypes (14 weeks vs. 41–71, $P = 0.033$), whereas circulating ACE levels were found to be associated with a better response to bevacizumab treatment. Besides, *in vivo* experiments showed a significantly higher antitumoral activity of bevacizumab in tumours derived from AGTR1-overexpressing breast cancer cells.

Conclusions A higher activity of ACE–angiotensin-II–AGTR1 axis is associated with a better response to bevacizumab, supporting that the RAS can be an important source of potential predictive markers of response to anti-angiogenic drugs.

Keywords Angiogenesis, angiotensin, angiotensin II receptor 1, breast cancer, colorectal cancer, polymorphisms.

Eur J Clin Invest 2015; 45 (12): 1325–1332

Introduction

Colorectal cancer (CRC) and breast cancer (BC) are leading causes of cancer mortality, with two million new cases diagnosed and one million deaths annually worldwide [1,2]. During the last decade, screening for early diagnosis, and different advances in surgery and therapy have led to an increase in

patient survival. However, tumour progression to advanced metastatic disease (mCRC or mBC) still involves a survival rate of only 10% (mCRC) or 21% (mBC) at 5 years [3,4]. In addition to different gene mutations or alterations of signalling pathways, the process of angiogenesis plays a critical role in the progression of CRC and BC [5,6]. Several molecular proangiogenic factors, including most notably the vascular endothelial growth factor (VEGF), are involved in angiogenesis. Therefore, the FDA approved in 2004 bevacizumab (Avastin, Genentech Inc., San Francisco, CA, USA), a monoclonal antibody against

^aThese authors share first authorship.

^bThese authors share senior authorship.

VEGF [7] as the first anti-angiogenic drug for the combined treatment with chemotherapy in patients with CRC [8], and BC [9], later being also approved for the treatment of other solid tumours. However, one of the main challenges in clinic is the lack of validated predictive biomarkers to select a population of patients responding to anti-angiogenic therapy.

Significantly, clinical data suggest that anti-angiogenic therapies have a better antitumor effect, including progression-free survival (PFS) and overall survival (OS), in those patients developing hypertension during treatment [10–19]. Of note, the association between response to treatment and development of secondary hypertension is observed regardless of the type of tumour or antiangiogenic drug. However, the exact mechanisms responsible for the development of hypertension secondary to anti-angiogenic therapy are not well understood. The lower nitric oxide production and the subsequent vasoconstriction accompanied by vascular rarefaction, or reduction of the density of capillary beds, have been proposed as mechanisms leading to VEGF signalling pathway inhibitor-induced hypertension [20]. Therefore, there may be several certain inherent characteristics in patient vasculature that not only help the anti-angiogenic efficacy, but

also influence the development of vascular complications that are clinically relevant. Indeed, signalling through VEGF receptor (VEGFR) also regulates the normal vascular permeability and endothelial cell survival. In the case of VEGF a specific genotype (VEGF-2578C/A) has been described in breast cancer to be associated with increased therapeutic benefit of bevacizumab [21,22]. It has also been suggested that VEGF-1498 C/T polymorphism is a possible predictor of the efficacy of adding bevacizumab to FOLFIRI treatment in first-line in mCCR patients [23]. Finally, it is interesting to note that a single nucleotide polymorphism in VEGFR-1 (rs9582036-A) was shown to be a possible predictor of response to bevacizumab in patients with metastatic pancreatic cancer [24]. However, more data are needed to confirm the potential role of VEGF and VEGFR-1 polymorphisms as predictors of response to anti-angiogenic therapy in mCCR.

The renin-angiotensin system (RAS), which regulates systemic blood pressure, also exerts local effects on cell proliferation, apoptosis, inflammation and angiogenesis in different tissues. In addition, there is evidence linking the RAS with tumorigenesis and tumour angiogenesis [25]. An important component of the RAS is angiotensin II receptor 1 (AGTR1), which both locally and systemically activates cellular processes involved in proliferation and migration. AGTR1 is also involved in tumour angiogenesis by stimulating VEGF synthesis [25]. In this regard, studies in our group indicate that expression of AGTR1 in tumour tissue can be a predictor of response to bevacizumab neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [26]. Gene polymorphisms exist in the various compo-

nents of the RAS that may possess clinical relevance. The genetic variants in AGTR1 gene may affect RAS activity, and specifically, AGTR1 1166A/C polymorphism appears with an allelic frequency of 0.4 and 0.29 in hypertensive and normotensive subjects, respectively [27]. Significantly, AGTR1 1166A/C has been related to mammary carcinogenesis [28]. In the case of AGT, other single nucleotide polymorphism, causing methionine to threonine substitution in 235 amino acid (M235T), has been associated with hypertension in caucasian populations [29], and several studies have linked TT genotype with a higher risk of breast cancer [28]. The most common polymorphism in the gene encoding angiotensin converting enzyme (ACE) is the insertion (I) or deletion (D) of a 287-bp fragment in intron 16 and is responsible for the interindividual variation in the ACE levels in blood and tissues [30]. It has been shown a correlation between ACE I/D and tumour size and survival in patients with renal carcinoma [31]. Also, RAS inhibitor drugs appear to provide protection against cancer in individuals with ACE genotype D/D, which is associated with high levels of expression and activity of ACE [32].

Each of these RAS-related polymorphisms, alone or in combination, can be related to an increased or decreased activity of the RAS, and therefore with the physiological processes controlled by RAS. Therefore, this study was aimed to explore the clinical relevance of AGTR1 A1166C (rs5186), AGT M235T (rs699), and ACE I/D 287 bp intron 16 (rs4646994) polymorphisms in patients with breast and colorectal cancer undergoing anti-angiogenic treatment. Our results suggest that ACE I/D polymorphism is associated with the activity of bevacizumab in combination with chemotherapy in patients with colorectal and breast cancer.

Materials and methods

Study design

Retrospective-prospective study of metastatic breast or colorectal cancer patients treated with bevacizumab and chemotherapy in the Oncology Department of the Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain. Ethics committee approval was obtained from our institution for the study, and all patients provided written informed consent. All patients met the following inclusion criteria: aged 18 or older, eligibility for receiving anti-angiogenic treatment with bevacizumab for the treatment of advanced disease and availability of clinic-pathological data. The characteristics of the 95 patients included in this study are listed in Table 1.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood in a MagNA Pure LC 2.0 Instrument (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain)

Table 1 Patient characteristics

	N (%)
N	95 (100)
Age: Median (Range)	59 (27-83)
Tumour Type	
Colorectal	46 (48.4)
Breast	49 (51.6)
TNM Stage	
IV	95 (100)
Histological Grade	
G1	13 (13.7)
G2	51 (53.7)
G3	20 (21.0)
Gx	11 (11.6)
Genotypes	
ACE rs1799752	
IN/IN	13 (13.8)
IN/DEL	52 (55.3)
DEL/DEL	29 (30.9)
ND	1
AGTR1 rs5186	
AA	49 (53.3)
AC	39 (42.4)
CC	4 (4.3)
nd	3
AGT rs699	
TT	38 (27.3)
CT	44 (31.7)
CC	13 (9.4)
nd	0
Serum-level sVEGF-A (ng/mL)	4.005 ± 2.03
Serum-level sACE (ng/mL)	147.08 ± 117.12

ND, not determined; ACE, angiotensin converting enzyme; VEGF, vascular endothelial grow factor.

using the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics). The SNPs AGTR1 A1166C (rs5186) and AGT M235T (rs699), and the 287-bp intron 16 ACE I/D polymorphism (rs4646994) were genotyped on the LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics) using the corresponding SimpleProbe Probes.

Table 2 Association between polymorphisms in some components of the renin-angiotensin system, VEGF-A and ACE circulating levels and response to treatment with bevacizumab

Genotype	cVEGF-A* (ng/mL)	cACE† (ng/mL)	Response % (GR vs. PRO)	TTF‡ (weeks)
ACE rs1799752				
IN/IN	3.86	97.34	63.6 vs. 36.4	14.00
IN/DEL	4.27	137.73	88.8 vs. 11.4	34.71
DEL/DEL	3.85	167.40	88.9 vs. 11.1	42.57
AGTR1 rs5186				
AA	4.01	143.19	75.6 vs. 24.4	39.70
AC	4.14	145.69	100 vs. 0	56.72
CC	3.25	99.48	75 vs. 25	16.14
AGT rs699				
TT	4.06	155.03	83.3 vs. 16.7	41.71
CT	3.96	133.13	85.4 vs. 14.6	37.00
CC	4.43	128.47	91.7 vs. 8.3	28.00

GR, Global response; PRO, Progression.

*Circulating vascular endothelial grow factor-A (VEGF-A) levels.

†Circulating angiotensin converting enzyme (ACE) levels.

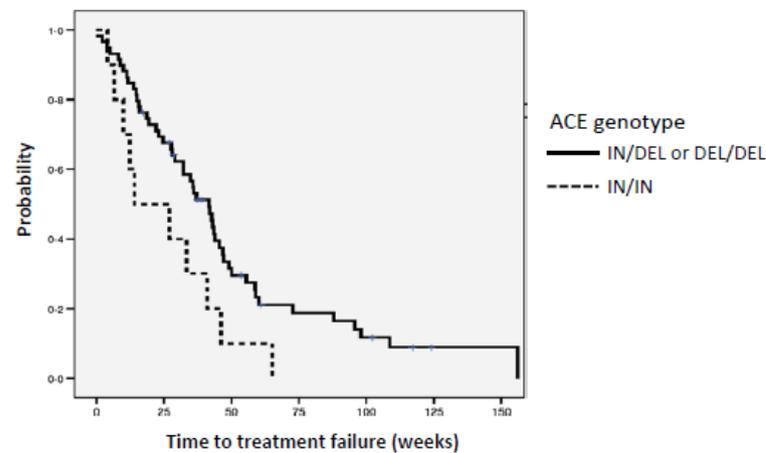
‡Time to treatment failure.

Determination of plasma VEGF and ACE levels

Circulating VEGF and ACE levels were analysed in plasma samples using the corresponding human VEGFA (Human VEGF-A, Platinum ELISA, eBioscience, San Diego, CA, USA) and human ACE ELISA kits (ACE Human ELISA kit, Abcam, Cambridge, UK).

Over-expression of AGTR1 gene in MCF-7 cells

MCF7 cells were obtained from The European Collection of Cell Cultures (ECACC) through Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), and cultured in MEM medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 15% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% of nonessentials amino acids and supplemented with antibiotics. To generate cells overexpressing AGTR1, MCF7 cells were stably transfected with plasmids pCR3-1 (control) and pCR3-1 hATR1, kindly provided by Dr. Terry S. Elton. In brief, cells were transfected with plasmids harbouring the KanR/NEO cassette using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as transfection reagent following the manufacturer's instructions, and neomycin-resistant cells were selected using complete medium supplemented with 500 µg/mL G418 (Life Technologies). Culture was refreshed every 2 or 3 days until colonies appeared, and then, cells were transferred to another flask for



ACE genotype	Median TTF (weeks)	IC95	Log-rank test
IN/IN	14.00	(0-36.8)	
IN/DEL or DEL/DEL	41.71	(33.6-49.81)	p: 0.033

Figure 1 Time to treatment failure and angiotensin converting enzyme (ACE) genotype: Kaplan–Meier analysis. ACE IN/IN genotype was associated with shorter time to treatment failure (TTF) compared to ACE IN/DEL and ACE DEL/DEL genotypes.

amplifying the resistant cell population. Overexpression in clones was confirmed by Western blot using a dilution 1 : 500 of anti-AGTR1 antibody (sc-1173, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Murine xenograft model

For orthotopic breast cancer xenografts, 6-week-old female immunocompromised mice (NOD.SCID strain) were previously implanted with 17 β -estradiol pellets on the lateral side of the neck. After 48 h, exponentially growing MCF7 cells (overexpressing and nonoverexpressing AGTR1 clones) were trypsinized, individualized and resuspended in BD Matrigel™ at a final concentration of 2×10^7 cells/mL, and 10^6 cells were injected (25G needle) in the fourth mammary fat pad to generate tumours. Four days after cells inoculation, animals were intraperitoneally injected every 3–4 days with 10 mg/kg of bevacizumab or vehicle (physiological saline) as a control. At the end of experiment mice were euthanized, tumours were excised and their volumes were estimated by measuring along their three axes and using the formula $\pi/6 (L \times W \times H)$.

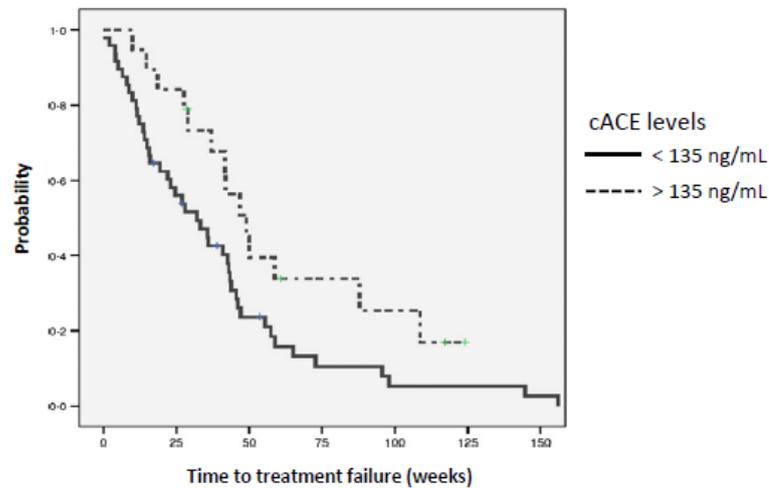
Statistical analyses

SRS (IBM, Armonk, NY, USA) for Windows version 8.0 for data analysis was used. Statistically different if $P < 0.05$ were considered. Hardy–Weinberg equilibrium for the polymorphisms

included in this study was assessed using a standard χ^2 test with one degree of freedom. All continuous variables are expressed as mean and median. The continuous variable sACE (serum angiotensin converting enzyme) was categorized into < 135 or ≥ 135 ng/mL. The Student's *t*-test for independent samples to compare means between two groups and the χ^2 analysis to compare differences in the distribution of genotypes and the maximum response obtained with bevacizumab or categorized sACE levels was applied. To establish relationship between time to treatment failure (TTF), overall survival (OS) and different genotypes has used Kaplan–Meier and log-rank test. The statistical significance of differences in tumour volume was analysed using two-sided Student's *t*-test.

Results

At the time of data analysis, 84.6% of patients had discontinued treatment, 53.8% due to disease progression, 23.1% because of toxicity and 7.7% for salvage surgery of advanced disease. The median duration of bevacizumab treatment was 41.7 weeks (95% CI 33.6–49.79), and maximum responses obtained in our series were 10.7% complete response (CR), 32.1% partial response (PR), 40.5% stable disease (SD), 14.3% progression (PRO) and was not evaluated (NE) in 2.4% of patients.



Circulating ACE	Median TTF (weeks)	IC95	Log-rank test
0-135 ng/mL	32.14	(17.99-46.28)	
>135 ng/mL	49.00	(38.12-59.87)	p: 0.036

Figure 2 Time to treatment failure and circulating angiotensin converting enzyme (cACE) levels: Kaplan–Meier analysis. Higher (> 135 ng/mL) levels of circulating ACE were associated with shorter time to treatment failure (TTF) compared to lower (< 135 ng/mL) levels.

The observed genotype frequencies of the analysed polymorphisms in ACE, AGTR1 and AGT genes are listed in Table 1. The genotype distributions of all three polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The corresponding minor allele frequencies (MAF) for each polymorphism were consistent with those given for European Caucasian populations in HapMap and dbSNP databases.

All genotypes studied were compared with the response obtained (Table 2). The ACE IN/IN genotype was associated with a higher rate of disease progression compared to DEL/IN and DEL/DEL genotypes (36% vs. 11.1% $P < 0.05$). Similarly, AGTR1 1166A/A genotype was also associated with a higher rate of disease progression compared to AGTR1 1166A/C and AGTR1 1166C/C genotypes (24.4% vs. 2.7% $P < 0.01$). No significant association was found between the different AGT M235T genotypes and disease progression. ACE IN/IN genotype was also found to be associated with shorter time to treatment failure (TTF) compared to ACE IN/DEL and ACE DEL/DEL genotypes (14 weeks vs. 41.71, $P = 0.033$; Fig. 1). No significant associations were found between the different AGTR1 and AGT genotypes and TTF.

No correlation was found between plasma circulating levels of VEGF-A and the different genotypes or the response

to treatment (Table 2). However, and as expected, significantly higher circulating ACE (cACE) levels were found in patients homozygous for the deletion in ACE gene locus (IN/IN, 97.34 ± 34.16 vs. DEL/DEL 167.40 ± 133.00 ng/mL, $P < 0.005$). Besides, higher circulating ACE levels were found to be associated with a better response to bevacizumab treatment (CR: 173.94 ng/mL, PR: 179.31 ng/mL, EE: 123.16 ng/mL, PRO 127.48 ng/mL; CR + PR + vs. EE PRO $P < 0.05$).

When a cut-off value of 135 ng/mL sACE was selected, the median TTF in the group of patients with > 135 ng/mL cACE was significantly higher than in the group with < 135 ng/mL cACE (32 vs. 24 weeks, $P < 0.036$, Fig. 2).

In order to improve the predictive value, an analysis combining ACE genotype and cACE levels was performed establishing two groups: Group A patients with cACE > 135 ng/mL and gACE DEL/DEL or IN/DEL (N: 19); and Group B, patients with cACE \leq 135 ng/mL and gACE IN/IN (N: 46). As expected, median TTF for group A was significantly higher than that of group B (46.86 vs. 28 weeks, $P = 0.04$, Fig. 3). While this joint analysis confirmed the predictive value of ACE genotyping and cACE values, it did not improve the predictive value of the model. New studies should confirm

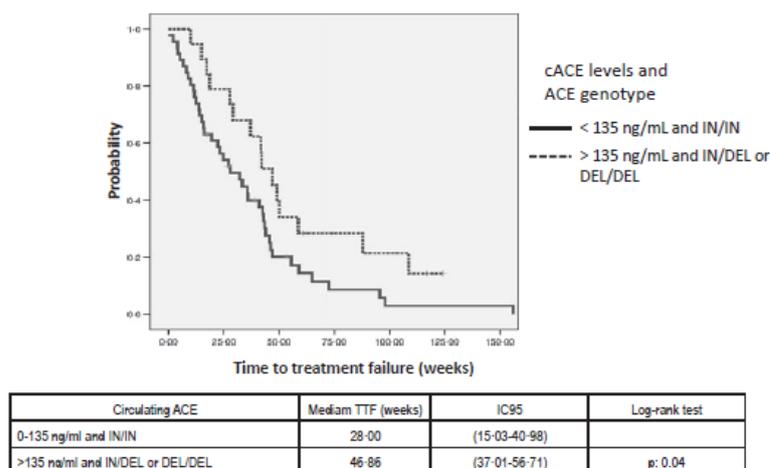


Figure 3 Time to treatment failure and circulating angiotensin converting enzyme (cACE) levels combined with ACE genotypes: Kaplan-Meier analysis. Higher ($> 135 \text{ ng/mL}$) levels of circulating ACE and IN/DEL or DEL/DEL ACE genotype were associated with shorter time to treatment failure (TTF) compared to lower ($< 135 \text{ ng/mL}$) levels and IN/IN ACE genotype.

these results and determine whether it is possible to improve the predictive value with others analyses.

In our analysis, the AGTR1 1166 A allele, which has been related to lower AGTR1 mRNA and reduced angiotensin II action [33], was associated with a higher rate of disease progression. Therefore, we next wanted to confirm whether an active ACE-AngII-AGTR1 is associated with a better response to the treatment with bevacizumab. To this end, the antitumoral activity of bevacizumab was assayed in tumours originated from orthotopically xenografted breast cancer MCF-7 cells overexpressing or not AGTR1 protein (Fig. 4a). As shown in Fig. 4b, the tumour volume of xenografts derived from a MCF7 cells stably overexpressing AGTR1 (Fig. 4a) was significantly reduced in mice treated with bevacizumab. On the contrary, xenografted tumours from control cells were not affected by bevacizumab treatment.

Discussion

The ability of VEGF to stimulate angiogenesis varies between individuals, and much effort has been made in the identification of VEGF pathway genetic variants as biomarkers of response to anti-angiogenic therapies (Lambrechts *et al.*, 24). However, no validated biomarkers have been discovered to date. Our study represents the first genetic analysis of RAS

genetic variants as markers predictive of bevacizumab treatment outcome. Several studies have shown that the AGTR1 A1166C genetic variant is associated with increased predisposition to hypertension and target organ damage [33-35]. In

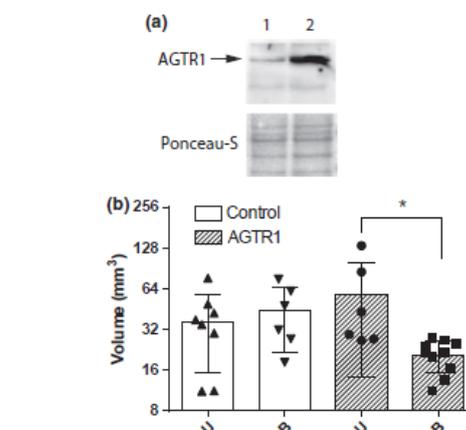


Figure 4 Effect of AGTR1 expression levels on the response to bevacizumab treatment. (a) AGTR1 protein expression in cell lysates from control (1) and AGTR1 overexpressing (2) cells. (b) Volume of tumour xenografts (log2 scale) generated from MCF-7 control cells (white bars) and MCF7-AGTR1 overexpressing cells (stripped bars). Mice were treated with saline (U) or bevacizumab (B). All data (symbols), mean (bars high) and SD (error bars) are represented (*, $P < 0.05$).

our analysis, AGTR1 1166 A/A genotype was associated with a higher rate of disease progression compared to A/C and C/C genotypes. Interestingly, AGTR1 protein expression,

which positively correlates with systolic and diastolic blood pressure, has been reported to be higher in subjects with C/C genotype [35]. Besides, AGTR1 1166C/C genotype is associated with a form of essential hypertension characterized by high plasma aldosterone and low plasma renin levels, possibly due to increased AGTR1 mRNA levels and augmented angiotensin II action [33]. Therefore, the AGTR1 1166A allele, when present in homozygous form may be related to a less active AngII-AGTR1 axis and to a higher rate of disease progression in patients treated with bevacizumab. Accordingly, our data support that the ACE IN/IN genotype is associated with a higher rate of disease progression, shorter TTF and lower circulating levels of the enzyme that catalyses the conversion of AngI to AngII. Besides, our experiments *in vivo* showed that the antitumoral activity of bevacizumab was significantly higher in tumours derived from AGTR1-overexpressing breast cancer cells. Taken together, our results indicate that a higher activity of the ACE-AngII-AGTR1 axis is associated with a better response to anti-angiogenic treatment with bevacizumab. Further studies are warranted to elucidate the exact role of the different components of RAS system in

the response of tumour cells to anti-angiogenic therapy. In summary, our study support that the RAS system can be an important source of potential predictive markers of response to anti-angiogenic drugs.

Acknowledgements

Supported by grants PI10-00534, PI12-02017 and PI13-00951 from the Plan Estatal de I + D + I, ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación and FEDER (European fund for regional development) funds.

Contributions

D.M-M., F.C., LM.L-S., V.H., A.M., C.V., A.G-E. and I.P. collected data and performed research. JR. H-R, A.R-A. and E.A. designed the study, analysed data and wrote the manuscript.

Address

Oncology Department, Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, University of Córdoba, Avda Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain (D. Moreno-Muñoz, J. R. de la Haba-Rodríguez, F. Conde, L. M. López-Sánchez, A. Valverde, V. Hernández, A. Gómez-España, I. Porras, A. Rodríguez-Ariza, E. Aranda); Spanish Cancer Network (RTICC), Instituto de Salud Carlos III, Avda Menéndez Pidal s/n, 14004, Córdoba, Spain (D. Moreno-Muñoz, J. R. de la Haba-Rodríguez, F. Conde, L. M. López-Sánchez, A. Valverde, V. Hernández, A. Martínez, C. Villar, A. Gómez-España, I. Porras, A. Rodríguez-Ariza, E. Aranda); Clinical Analysis Department, Maimonides Institute for Biomedical

Research (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, University of

Córdoba, Spain (A. Martínez); Pathology Department, Maimonides Institute for Biomedical Research (IMIBIC), Hospital Reina Sofía, University of Córdoba, Avda Menéndez Pidal s/n, 14004, Córdoba, Spain (C. Villar).

Correspondence to: Antonio Rodríguez-Ariza, IMIBIC, Hospital Universitario Reina Sofía, Avda Menéndez Pidal s/n, 14004, Córdoba, Spain. Tel.: +34-957213848; fax: +34 957010452; e-mail: antonio.rodriguez.exts@juntadeandalucia.es

Received 28 May 2015; accepted 24 October 2015

References

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;**60**:277-300.
- Eccles SA, Aboagye EO, Ali S, Anderson AS, Armes J, Berditchewski F *et al*. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2013;**15**:R92.
- Cardoso F, Castiglione M. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;**20**(Suppl 4):15-8.
- Davies JM, Goldberg RM. Treatment of metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol* 2011;**38**:552-60.
- Winder T, Lenz HJ. Beyond KRAS: a new approach in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2010;**11**:706-7.
- Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;**23**:1782-90.
- Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L *et al*. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997;**57**:4593-9.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W *et al*. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;**350**:2335-42.
- Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA *et al*. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;**357**:2666-76.
- Bono P, Elfving H, Utraiainen T, Osterlund P, Saarto T, Alanko T *et al*. Hypertension and clinical benefit of bevacizumab in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2009;**20**:393-4.
- Ryanne WR, Lindenberg PA, Slack R, Noone AM, Marshall JL, He AR. Evaluation of hypertension as a marker of bevacizumab efficacy. *J Gastrointest Cancer* 2009;**40**:101-8.
- Scartozzi M, Galizia E, Chiarrini S, Giampieri R, Berardi R, Pierantoni C *et al*. Arterial hypertension correlates with clinical outcome in colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab. *Ann Oncol* 2009;**20**:227-30.
- De SA, Carlomagno C, Pepe S, Bianco R, De PS. Bevacizumab-related arterial hypertension as a predictive marker in metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;**68**:1207-13.
- Osterlund P, Soveri LM, Isoniemi H, Poussa T, Alanko T, Bono P. Hypertension and overall survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing chemotherapy. *Br J Cancer* 2011;**104**:599-604.

- 15 Lombardi G, Zustovich F, Farina P, Fiduccia P, Della PA, Polo V *et al.* Hypertension as a biomarker in patients with recurrent glioblastoma treated with antiangiogenic drugs: a single-center experience and a critical review of the literature. *Anticancer Drugs* 2013;**24**:90–7.
- 16 Schuster C, Eikesdal HP, Puntervoll H, Geisler J, Geisler S, Heinrich D *et al.* Clinical efficacy and safety of bevacizumab monotherapy in patients with metastatic melanoma: predictive importance of induced early hypertension. *PLoS ONE* 2012;**7**:e38364.
- 17 Khoja L, Kumaran G, Zee YK, Murukesh N, Swindell R, Saunders MP *et al.* Evaluation of hypertension and proteinuria as markers of efficacy in antiangiogenic therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol* 2013;**48**:430–4.
- 18 Tahover E, Uziely B, Salah A, Temper M, Peretz T, Hubert A. Hypertension as a predictive biomarker in bevacizumab treatment for colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2013;**30**:327.
- 19 Wagner CC, Held U, Kofmehl R, Battegay E, Zimmerli L, Hofer S. Role of arterial hypertension as a predictive marker for bevacizumab efficacy in recurrent glioblastoma – a prospective analysis. *Acta Oncol* 2013;**53**:572–5.
- 20 de Jesus-Gonzalez N, Robinson E, Moslehi J, Humphreys BD. Management of antiangiogenic therapy-induced hypertension. *Hypertension* 2012;**60**:607–15.
- 21 Schneider BP, Wang M, Radovich M, Sledge GW, Badve S, Thor A *et al.* Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *J Clin Oncol* 2008;**26**:4672–8.
- 22 Tan MH, Tan CS, Lim WY. Race to report: are vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms associated with outcome in advanced breast cancer patients treated with Paclitaxel plus bevacizumab? *J Clin Oncol* 2009;**27**:1342–3.
- 23 Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L, Cremolini C, Masi G, Frumento P *et al.* Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011;**11**:247.
- 24 Lambrechts D, Claes B, Delmar P, Reumers J, Mazzone M, Yesilyurt BT *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.
- 25 George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* 2010;**10**:745–59.
- 26 Sanchez-Rovira P, Segui MA, Llombart A, Aranda E, Anton A, Sanchez A *et al.* Bevacizumab plus preoperative chemotherapy in operable HER2 negative breast cancer: biomarkers and pathologic response. *Clin Transl Oncol* 2013;**15**:810–7.
- 27 Wang WY, Zee RY, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet* 1997;**51**:31–4.
- 28 Xi B, Zeng T, Liu L, Liang Y, Liu W, Hu Y *et al.* Association between polymorphisms of the renin-angiotensin system genes and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;**130**:561–8.
- 29 Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charu A *et al.* Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;**71**:169–80.
- 30 Rigat B, Hubert C, Henc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;**86**:1343–6.
- 31 Rocken C, Neumann K, Carl-McGrath S, Lage H, Ebert MP, Dierkes J *et al.* The gene polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme correlates with tumor size and patient survival in colorectal cancer patients. *Neoplasia* 2007;**9**:716–22.
- 32 van der KR, Siemes C, Coebergh JW, van Duijn CM, Hofman A, Stricker BH. Renin-angiotensin system inhibitors, angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, and cancer: the Rotterdam Study. *Cancer* 2008;**112**:748–57.
- 33 Hannila-Handelberg T, Kontula KK, Pauku K, Lehtonen JY, Virtamo J, Tikkanen I *et al.* Common genetic variations of the renin-angiotensin-aldosterone system and response to acute angiotensin I-converting enzyme inhibition in essential hypertension. *J Hypertens* 2010;**28**:771–9.
- 34 Hindorf LA, Heckbert SR, Tracy R, Tang Z, Psaty BM, Edwards KL *et al.* Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms in the cardiovascular health study: relation to blood pressure, ethnicity, and cardiovascular events. *Am J Hypertens* 2002;**15**:1050–6.
- 35 Ceolotto G, Papparella I, Bortoluzzi A, Strapazon G, Ragazzo F, Bratti P *et al.* Interplay between miR-155, AT1R A1166C polymorphism, and AT1R expression in young untreated hypertensives. *Am J Hypertens* 2011;**24**:241–6.

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE CARCINOMA DE COLÓN Y CARCINOMA DE MAMA AVANZADO TRATADOS CON BEVACIZUMAB

Juan De La Haba-Rodríguez, Antonio Martínez, María José Ortiz, Cristina Morales, Gema Pulido, Auxiliadora Gómez, Diana Moreno, Beatriz Rodríguez, Antonio Rodríguez, Enrique Aranda. *Servicio De Oncología Médica Hospital Universitario Reina Sofía. Instituto Maimonides De Investigación. Universidad De Córdoba.*

Introducción: La hipertensión arterial (HTA) es un efecto secundario común al uso de esta estrategia terapéutica. En la actualidad no disponemos de biomarcadores útiles para identificar aquellos pacientes con una mayor probabilidad de respuesta a terapia antiangiogénica. Algunos trabajos han relacionado la aparición de HTA con la respuesta y mejor evolución. Existen polimorfismos genéticos que se correlacionan en la población general con una mayor predisposición HTA. El objetivo del presente estudio es analizar la relación existente entre diferentes polimorfismos de HTA y la respuesta y evolución de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal (CCR) y de mama (CM) tratados con bevacizumab.

Materiales y Métodos: Hemos estudiado en 102 pacientes (63 CCR y 39 CM) los siguientes polimorfismos genéticos relacionados con HTA: VEGF -2578 C/A, VEGF -1498 C/T VEGFR-1, Intrón 29, ECA INS/ DEL Intron 16, AGTR1 1166 A / C, AGT M235T, ADRB1 Gly389Arg, ADRB2 Gln27Glu, ADRB2 Gly16Arg, ADRB3 Trp64Arg, GNAS 393 T>C y GNB3 825 C>T. El estudio de los polimorfismos se ha realizado mediante RT-PCR utilizando el sistema de genotipado SimpleProbe probes de Roche Applied Science en un Light-Cycler® 480 Real-Time PCR System.

Resultados: Hasta el momento hemos encontrado una relación con la respuesta en los siguientes SNPs VEGF -2578 C/A, ECA INS/DEL Intron 16 y AGTR1 1166 A / C (Tabla 1).

Conclusiones: Polimorfismos de predisposición a HTA, pueden ser biomarcadores útiles para identificar pacientes con una mayor probabilidad de beneficio a tratamiento con bevacizumab. Se precisan de estudios prospectivos que conforme esta observación.

Tabla 1: Aspectos tumorales que influyen en el deseo de conocer el diagnóstico

SNPS	Pro	EE	RP	RC	Chi-Cuadrado/ p
SNP AGTR1 1166 A/C					
AA	11(25%)	14(31,8%)	16(36,0%)	3(6,8%)	19,020/0,015
AC	0(0%)	13(43,3%)	11(36,7%)	4(13,3%)	
CC	1(25%)	1(25,0%)	0(0%)	2(50%)	
SNP VEGF -2578 C/A					
AA	7(41,2%)	3(17,6%)	6(35,0%)	1(5,9%)	17,825/0,023
AC	4(9,5%)	20(47,6%)	12(28,6%)	4(9,5%)	
CC	1(5%)	6(30,0%)	9(45,0%)	4(20%)	
ECA IN/DEL Intron 16 AA*					
IN/IN	3(42,9%)	0(0,0%)	3(42,9%)	1(14,3%)	16,887/0,031
IN/DEL	2(6,9%)	13(44,8%)	9(31,0%)	4(13,8%)	
DEL/DEL	0(0%)	4(30,8%)	8(61,5%)	0(0%)	

11.ANEXOS

11.1 ANEXO 1: Acta de la Comisión de Ética e Investigación sanitaria



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Hospital Universitario Reina Sofía

Óscar Degallón Rojo, Secretario de la Comisión de Ética e Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba,

CERTIFICA

Que en la reunión de la Subcomisión Permanente de Investigación Sanitaria celebrada el día 9 de abril de 2010 se ha estudiado y evaluado el Proyecto de Investigación titulado "Polimorfismos genéticos de VEGF, VEGFR-1 y del sistema renina-angiotensina como posibles predictores de respuesta a terapia antiangiogénica en cáncer de colon y mamal" en el que figura como Investigador Principal el Dr. Enrique Aranda Aguilar adscrito (Servicio de Oncología médica) habiendo considerado los integrantes de dicha Subcomisión que el citado proyecto respeta los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki de 1964, de la Asociación Médica Mundial, y enmiendas posteriores, y en el Convenio del Consejo de Europa de 1996, relativo a los Derechos Humanos y a la Biomedicina, y se adecua a las condiciones de la convocatoria, demostrando sus autores conocer suficientemente los antecedentes y el estado actual del tema que proponen investigar, estando bien definidos sus objetivos y siendo adecuada su metodología, por lo que hacen constar la viabilidad en todos sus términos del proyecto de investigación, estimando que los resultados pueden ser de gran interés.

Se hace constar, de acuerdo con el art. 27,5 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, que la presente certificación se emite con anterioridad a la aprobación del Acta correspondiente.

En Córdoba, a nueve de abril de dos mil diez.

EL SECRETARIO.

Fdo. Óscar Degayón Rojo

11.2 ANEXO 2: Consentimiento informado

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

Su médico le ha pedido su consentimiento para que participe en el estudio titulado **"ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON HIPERTENSION ARTERIAL COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A TRATAMIENTO CON ANTIANGIOGENICO EN CANCER."** Le pedimos que colabore en la realización del estudio molecular que se llevará a cabo. Para ello, le solicitamos que nos ceda una muestra de sangre, para que podamos investigar la expresión de algunos genes relacionados con la hipertensión arterial.

Importancia:

El análisis del material biológico que usted done para este estudio será de fundamental importancia para saber más sobre su enfermedad y la mejor manera de tratarla.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

Ninguno. No será necesario que se someta a pruebas adicionales por haber concedido su permiso ni modificara en modo alguno su tratamiento.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal del Servicio de Oncología Médica del Hospital Reina Sofía de Córdoba en el teléfono: 957 011 638 o en el correo electrónico: juahaba@gmail.com

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

“ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON HIPERTENSION ARTERIAL COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A TRATAMIENTO CON ANTIANGIOGENICO EN CANCER..”

Yo (Nombre y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio “ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON HIPERTENSION ARTERIAL COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A TRATAMIENTO CON ANTIANGIOGENICO EN CANCER..”
- He recibido suficiente información sobre el estudio “ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON HIPERTENSION ARTERIAL COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A TRATAMIENTO CON ANTIANGIOGENICO EN CANCER..” He hablado con el profesional sanitario informador:
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado* “ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON HIPERTENSION ARTERIAL COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A TRATAMIENTO CON ANTIANGIOGENICO EN CANCER..”

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
sanitario informador

11.3 ANEXO 3: Documento de solicitud extracción de muestra de ADN

* Campos obligatorios

NO TAPAR CON LA ETIQUETA ->



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

HOSPITAL UNIVERSITARIO
"Reina Sofía".

Reservado para
etiqueta n.h.c.
No escribir

Petición y consentimiento informado para estudios genéticos.

ETIQUETA

Unidad	Habitación	Cama
0	0	0
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9

Número de tarjetas enviadas (si son más de una)
 2 3 4 5

Datos clínicos (legible, por favor)

Estudio

Caso aislado Estado familiar Confirmación

si familiar (*)

caso índice pariente próximo pariente lejano

(*) paciente primo de primer o segundo grado (padres, hijos, primos, tíos, abuelos); abuelo; hijo; otros casos.

Finalidad Diagnóstico Control Pronóstico Epidemiología

¿Prenatal? si no

Tipo de muestra

Sangre periférica
 Líquido amniótico
 Vellosidad corial
 Raspado bucal
 Tumor
 otras (especificar)

Tipo de petición

Interconsulta
 Estudio molecular
 Consejo genético
 FISH
 Cariotipo en sangre periférica (sólo heparina sodio)

Solicitud de estudio

Prader-Willi Duchenne/Becker
 Angelman Ataxia de Friedrich
 Willems X frágil
 Smith-Magenis Microdelec. crom. Y
 Di George Incontinencia pigment
 otras microdelec. BRCA1 (consultar)
 Steinert BRCA2 (consultar)

Genotipados

Hemocromatosis
 Déficit de A1AT
 Fibrosis quística
 Apolipoproteína E
 B-RAF (V599E)

Dosificación génica (DNA)

Cuantificación relativa de HER-2
 Cuantificación relativa de DNA mitocondrial
 Pérdida de heterocigosidad de p53

Expresión génica (RNA)

Cuantificación relativa de DPD
 Cuantificación relativa de TS
 Cuantificación relativa de TPh
 Cuantificación relativa de COX2
 Cuantificación relativa de aromatasa

Otras peticiones

Extensión: ADN (Hes) (Dr. Morera)

SOLO PARA ESTUDIOS PRENATALES (amniocentesis)

La paciente, abajo firmante, DECLARA haber sido informada por su tocólogo/a de las características y limitaciones del procedimiento diagnóstico al que va a ser sometida en el protocolo de rutina, esto es, la detección de anomalías numéricas de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, así como del sexo cromosómico del feto. Posibles limitaciones del estudio son: mosaicismos cromosómicos, contaminación con células maternas, aneuploidias producidas por no disyunción en segunda meiosis, etc.

Cualquier otro procedimiento diagnóstico prenatal deberá ser consultado puntualmente con su ginecólogo y/o genetista, quienes le indicarán la disponibilidad técnica y las limitaciones y características del mismo.

motivo de la petición

antecedentes personales
 antecedentes familiares
 cribado bioquímico
 cribado ecográfico
 edad materna
 otros (especificar)

Sexo ecográfico varón mujer dudoso

embarazo múltiple si no

EV si no

semana ecográfica

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Estado civil	Médico	Residentes en rotación
0	0	0
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9

Servicio	Firma del médico
0	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	

Consentimiento del paciente o representante legal

Declaro haber sido informado a satisfacción



FORMA DE COMPLETACIÓN: CORRECTA ■ INFORMACIÓN ⓘ ⇄

11.4 ANEXO 4: Criterios RECIST 1.1²¹⁸

Parámetros de evaluación

Enfermedad medible	Cómo medir	Medida unidimensional: diámetro máximo
	Tamaño mínimo	≥ 10 mm con TC helicoidal o RM (no menor que el doble del espesor de corte) ≥ 20 mm en radiografía de tórax bien definida y rodeada de aire
	Número total de lesiones	Máximo 5 lesiones y hasta 2 por órgano
	Ganglios linfáticos	Ganglios con eje corto ≥ 15 mm pueden ser lesión diana
Enfermedad no medible		Lesiones inferiores a 10 mm Adenopatías con eje corto ≥ 10 y ≤ 15 mm Lesiones blásticas Quistes simples, indeterminados o complejos Lesiones previamente tratadas o irradiadas salvo que progresen

Criterios de respuesta

Tipo	
Respuesta completa (RC)	Desaparición de todas las lesiones y ausencia de ganglios patológicos
Respuesta parcial (RP)	Disminución $\geq 30\%$ de la suma de los diámetros máximos
Enfermedad estable (EE)	No cumple criterios de respuesta parcial ni de progresión
Progresión	Aumento $\geq 20\%$ de la suma de los diámetros y aumento absoluto ≥ 5 mm en la suma de diámetros

11.5 ANEXO 5: Sistema de estadiaje del Cáncer colorrectal AJCC TNM (2010, 7ª edición)²⁶¹

Tumor Primario (T)			
Tx	El tumor primario no se puede evaluar		
T0	No evidencia de tumor primario		
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de lámina propia		
T1	El tumor invade la submucosa		
T2	El tumor invade la muscular propia		
T3	El tumor invade a través de la muscular propia los tejidos pericorrectales		
T4a	El tumor penetra el peritoneo visceral		
T4b	El tumor invade directamente otros órganos o estructuras		
Ganglios Linfáticos Regionales (N)			
Nx	No es posible evaluar el estado ganglionar		
N0	No metástasis en los ganglios linfáticos regionales		
N1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales		
N1a	Metástasis en 1 ganglio linfático regional		
N1b	Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales		
N1c	Depósito tumoral en subserosa, mesenterio o tejidos sin afectación regional linfática		
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales		
N2a	Metástasis en 4 a 6 ganglios linfáticos regionales		
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales		
Metástasis a distancia (M)			
Mx	No se pueden evaluar		
M0	No metástasis a distancia		
M1	Metástasis a distancia		
M1a	Metástasis confinada a un órgano o localización		
M1b	Metástasis en más de un órgano o peritoneo		
Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1-N1c	M0
	T1	N2a	M0

IIIB	T3-T4a	N1-N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b

11.6 ANEXO 6: Sistema de estadiaje del Cáncer de Mama AJCC TNM (2010, 7ª edición)²⁶¹

Tumor Primario (T)	
Tx	El tumor primario no se puede evaluar
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Carcinoma ductal “in situ”
Tis (LCIS)	Carcinoma lobulillar “in situ”
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget del pezón sin tumor
T1	Tumor < 2 cm en su mayor dimensión
T1mi	Microinvasión <0.1 cm en su mayor dimensión
T1a	Tumor > 0.1 cm pero no > 0.5 cm en su mayor dimensión
T1b	Tumor > 0.5 cm pero no > 1 cm en su mayor dimensión
T1c	Tumor > 1 cm pero no > 2 cm en su mayor dimensión
T2	Tumor > 2 cm pero no > 5 cm en su mayor dimensión
T3	Tumor > 5 cm en su mayor dimensión
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica y/o piel
T4a	Extensión a pared torácica sin incluir el músculo pectoral mayor
T4b	Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, o nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama que no cumple criterios de carcinoma inflamatorio
T4c	Ambos T4a y T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio
Ganglios Linfáticos Regionales (N)	
Nx	No es posible evaluar el estado ganglionar
N0	No metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en ganglios ipsilaterales móviles en niveles I,II axilar
N2	Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales niveles I,II axilar, fijos o agrupados, o en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes en ausencia de afectación clínica axilar
N2a	Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales en niveles I,II axilar fijos entre sí o a otras estructuras
N2b	Metástasis sólo en ganglios ipsilaterales de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes y en ausencia de afectación clínica evidente axilar
N3	Metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales (nivel II axilar), o en cadena mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes en presencia de afectación axilar clínicamente evidente; o metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales con o sin afectación axilar o de la mamaria interna
N3a	Metástasis en ganglios infraclaviculares
N3b	Metástasis en cadena mamaria interna y axilar ipsilateral

N3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
Ganglios Linfáticos Regionales (pN)	
pNx	No es posible evaluar el estado ganglionar
pN0	No afectación histológica, sin estudios adicionales para células tumorales aisladas
pN0(i-)	No afectación ganglionar histológica, H&E y IHQ negativas
pN0(i+)	Presencia de células tumorales aisladas por H&E o IHQ, ninguna agrupación > 0.2 mm
pN0(mol-)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular negativo (RT-PCR)
pN0(mol+)	No afectación ganglionar histológica, estudio molecular positivo (RT-PCR)
pN1mi	Micrometástasis (> 0.2 mm, ninguna > 2.0 mm o > 200 células)
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos y/o en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos, al menos una metástasis >2mm
pN1b	Metástasis en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares linfáticos y en la mamaria interna con afectación microscópica detectada por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparente
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares linfáticos, o afectación clínicamente aparente de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares linfáticos (al menos un depósito tumoral > 2.0 mm)
pN2b	Metástasis clínicamente aparente en ganglios de la mamaria interna en ausencia de afectación axilar
pN3	Metástasis en > 10 ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas clínicamente negativas de la mamaria interna; o en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
pN3a	Metástasis en > 10 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral > 2.0 mm), o metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares
pN3b	Metástasis en ganglios de la mamaria interna ipsilaterales clínicamente aparentes en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares con metástasis microscópicas de la mamaria interna detectadas por biopsia de ganglio centinela pero no clínicamente aparentes
pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
Metástasis a distancia (M)	
Mx	No se pueden evaluar
M0	No metástasis a distancia
cM0(i+)	No evidencia clínica ni radiológica de metástasis pero presencia de depósitos de células tumorales detectadas en sangre circulante, médula ósea u otro tejido ganglionar no regional que es < 0.2 mm en un paciente sin signos ni síntomas de metástasis
M1	Metástasis a distancia

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1b	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1b	N1mi	M0
IIA	T0	N1c	M0
	T1b	N1c	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

H&E: hematoxilina y eosina. IHQ: inmunohistoquímica