



João Pedro Almendra Correia

Inibidores do VEGF usados como antitumorais

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Pedro Almendra Correia

Inibidores do VEGF usados como antitumorais

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João Pedro Almendra Correia, estudante no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009021106, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à excepção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de julho de 2015.

Índice

Abreviaturas e Siglas	2
Resumo	3
Abstract	3
Introdução	4
Família do factor de crescimento endotelial vascular	5
Receptores VEGF	6
Terapêutica inibitória dos VEGF's na terapia anti-tumoral	7
Terapêutica usando anticorpos monoclonais	8
Bevacizumab	8
Aflibercept (VEGF Trap)	9
Inibidores da Tirosina-Cinase	10
Sunitib	10
Sorafenib	11
Pazopanib	11
Terapia anti-angiogénica no contexto metastático	12
Terapia anti-angiogénica no contexto adjuvante	14
Terapia anti-angiogénica no contexto neo-adjuvante	15
Entraves à terapia anti-angiogénica	15
Heterogeneidade da vasculatura tumoral	16
Mecanismos alternativos de sinalização pro-angiogénicos	17
Adaptação das células tumorais a condições de stress	17
Mecanismos alternativos de vascularização tumoral	18
Terapia anti-angiogénica e o futuro	19
Conclusão	22

Abreviaturas e Siglas

ALT – (do inglês) Alanine Aminotransferase

AST – (do inglês) Aspartate Aminotransferase

DCE-MRI – (do inglês) Dynamic contrast-enhanced Magnetic Resonance Imaging

FDA – (do inglês) Food Drug Administration

FGF – (do inglês) Fibroblast Growth Factor

GIST – (do inglês) Gastrointestinal Stromal Tumour

HER – (do inglês) Human Epidermal Growth Factor Receptor

HGF – (do inglês) Hepatocyte Growth Factor

IgG – (do inglês) Immunoglobulin G

IMG – (do inglês) Intussusceptive Microvascular Growth

mCRC – (do inglês) Metastatic Colorectal Cancer

mRCC – (do inglês) Metastatic Renal Cell Carcinoma

NSCLC – (do inglês) Non-Small-Cell Lung Carcinoma

OS – (do inglês) Overall Survival

PFS – (do inglês) Progression Free Survival

PLGF – (do inglês) Placental Growth Factor

RCC – (do inglês) Renal Cell Carcinoma

RTK – (do inglês) Receptor Tyrosine Kinase

TKI – (do inglês) Tyrosine Kinase Inhibitor

VEGF – (do inglês) Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR – (do inglês) Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Resumo

Este trabalho tem como objetivo fazer um resumo acerca da terapia anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), um tipo de terapia promissora focada na vasculatura tumoral que acarreta efeitos secundários significativamente mais brandos, quando comparada com outro tipo de terapias. Aborda ainda o papel da angiogénese mediada pelos diversos VEGF's na proliferação tumoral e como o uso deste tipo de agentes pode trazer grandes benefícios para os doentes cancerígenos. São ainda apresentados os medicamentos mais em foco e os seus resultados nos diversos ambientes cancerígenos, baseados em ensaios clínicos recentes. Trata também da questão da resistência a este tipo de terapia, abordando os tópicos mais proeminentes tais como mecanismos alternativos de vascularização tumoral, mecanismo alternativos de sinalização pro-angiogénicos e a adaptação das células tumorais a condições de stress. Por último, faz um prognóstico do caminho que este tipo de terapia poderá e deverá seguir

Abstract

This paper aims to make a summary about the anti-VEGF therapy (Vascular Endothelial Growth Factor), a type of promising therapy focused on tumor vasculature which carries significantly milder side effects compared with other therapies. It also addresses the role of angiogenesis mediated by VEGF's in tumor proliferation and how the use of these agents can bring great benefits for cancer patients. They also present the medications that are more in focus and results in the various carcinogenic environments, based on recent clinical trials. It also addresses the issue of resistance to this type of therapy, addressing the most prominent issues such as alternative mechanisms of tumor vasculature, alternative signaling mechanism pro-angiogenic and tumor cell adaptation to stress conditions. Finally, it makes a prediction of the path that this type of therapy must follow.

Introdução

Os VEGF ou factor de crescimento endotelial é uma família de moléculas primeiramente identificadas e isoladas como um mitogénio específico das células endoteliais com capacidade de induzir angiogénese tanto em processos normais como patológicos.

A angiogénese é um processo fisiológico normal do organismo que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes, a alteração para que o processo ocorra parte de um desequilíbrio entre agentes pró e anti angiogénicos. Este processo no qual os VEGF's desempenham um papel crítico, é responsável no adulto por regular o ciclo reprodutivo da mulher, a cicatrização de feridas, a inflamação, a permeabilidade vascular, o tónus vascular e a hematopoiese. Está ainda relacionado com diversos processos patológicos como degeneração macular, artrite reumatóide, crescimento tumoral e metastização. A angiogénese é assim vista como um processo chave no crescimento e maturação tumoral, a neovascularização do tumor vai então resultar num maior aporte sanguíneo fazendo assim chegar ao tumor uma maior quantidade de oxigénio e nutrientes tornando assim o seu desenvolvimento sustentável.

Olhando então para o papel dos VEGF's neste processo patológico. Judah Folkman, em 1971, foi o primeiro a teorizar os benefícios que uma terapia focada nos fatores de crescimento poderia trazer no combate ao desenvolvimento tumoral. Judah ajudou assim a clarificar o papel destes mediadores, bem como ao agregar informação doutros estudos posteriores foi possível estabelecer que: a) vascular endothelial growth factor A é um mediador chave tanto no despertar como no desenrolar deste processo, b) VEGF's estão sobre-expressos na maioria dos tumores sólidos e c) a inibição dos VEGF's consegue suprimir o crescimento de tumores em modelos animais (2-4).

Assente nestas observações, têm vindo a ser desenvolvidas várias terapias focadas na angiogénese, bloqueando os mediadores VEGF's e inibindo assim os processos fisiológicos desencadeados por estes.

Assim, é objetivo deste trabalho analisar o progresso deste tipo de terapia, abordando as questões actuais existentes sobre o tema e propondo possíveis caminhos para que este tipo de terapia se venha a desenvolver por forma a poder tornar-se mais eficaz.

Família do factor de crescimento endotelial vascular

A família dos VEGF's é constituída por vários mediadores sendo eles VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-F e PLGF. Estes vão atuar através de três recetores tirosina cinase – VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Apesar de as suas funções fisiológicas não estarem completamente determinadas certos VEGFR's têm sido alvo de terapias anti tumorais devido ao seu papel já conhecido na angiogénese (5).

O mediador mais importante é o VEGF-A, a sua atividade como o nome indica foi estudada maioritariamente nas células endoteliais mas é sabido que tem atividade noutros tipos de células nomeadamente nas células neuronais, em células tumorais e em células do epitélio renal. (6) Estudos in-vitro demonstraram ainda a sua atividade na estimulação da mitogénese das células endoteliais e na sua migração. Estudos de deleção do gene VEGF-A demonstraram a sua relação estreita com a angiogénese, uma vez que os ratos que apresentavam esta condição apresentaram letalidade embrionária devido a vários defeitos de formação das estruturas vasculares.

Apesar das funções do VEGF-B continuarem pouco claras é sabido que forma ligação com o VEGFR-1. Têm ainda sido sugeridos vários papéis onde este está envolvido, nomeadamente na função cardíaca em adultos. No entanto, parece não ter um grande envolvimento no que diz respeito ao desenvolvimento angiogénico, nem no desenvolvimento cardiovascular. Chegou-se a estas conclusões em estudos knockout onde foi feita a deleção do gene VEGF-B e apesar de algumas anormalidades na condução cardíaca os ratos eram viáveis (7).

O VEGF-C maturado liga-se tanto ao VEGFR-2 como VEGFR-3. Este mediador da família VEGF está envolvido no desenvolvimento linfático e na sua manutenção no ser adulto (8).

Estudos knockout efetuados em ratos demonstraram que a sua deleção provoca letalidade embrionária. A perda deste gene é assim definida por linfedema devido ao desenvolvimento deficiente da vasculatura linfática. Foi também possível observar o desenvolvimento normal dos vasos sanguíneos uma vez que estes não apresentaram alterações nos ratos que possuíam esta condição, permitindo assim concluir que à primeira vista este não está fortemente relacionado com a angiogénese (9).

VEGF-D tem como recetores VEGFR-2 e 3. Estudos onde foi feita a deleção do gene VEGF-D evidenciaram uma viabilidade embrionária dos ratos, observando-se também a presença da vasculatura linfática normal. Estes dados sugerem que o VEGF-C e outros fatores de

crescimento possam ser capazes de preencher o seu papel durante o desenvolvimento e também no ser adulto (10).

O último membro da família dos VEGF's é o PLGF. É expresso primariamente na placenta tal como o seu nome sugere, mas é também encontrado no coração, na retina, na pele e músculo-esquelético. Os estudos onde este gene estava deletado demonstraram reduzida vascularização do corpo lúteo e da retina, mas os ratos eram viáveis (11).

Receptores VEGF

Para estimularem uma resposta fisiológica todos os membros da família dos VEGF's necessitam de se ligar a recetores tirosina cinase, recetores estes que se encontram na superfície celular. Existem três recetores tirosina-cinase que medeiam as funções angiogénicas da família dos VEGF- VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Embora estes recetores potenciem diversas funções, estes são estruturalmente muito semelhantes. Cada um é assim constituído por um domínio com sete partes tipo imunoglobulina extracelular, um segmento justa-membranar e um domínio proteico divisível intracelular tirosina-cinase e finalmente por uma cauda terminal do tipo carboxilo. É através destes que as suas funções na angiogénese são mediadas. Assim, quando se dá a ligação recetor-mediador é induzida uma transfosforilação através da qual os recetores se tornam ativos. Esta fosforilação irá ocorrer em diferente extensão, tempo e localização. O receptor VEGFR-2 aparenta ser o mediador mais importante envolvido na sinalização angiogénica induzida pelos VEGF's. O VEGFR-1 apesar de a sua função não estar particularmente bem definida já existem dados que apontam para uma função de modulador do VEGFR-2. Esta função é exercida funcionando este como recetor chamariz, utilizando a sua forte afinidade para os VEGF, aprisionando o ligando prevenindo assim a sua ligação a outros recetores (12). O recetor VEGF é essencial durante o desenvolvimento embrionário, esta afirmação é reforçada com os ensaios clínicos sobre animais VEGFR-1 nulo que mostraram letalidade embrionária devido a uma rede vascular desorganizada e destruturada (13).

No entanto, ratos que não expressem o domínio tirosina-cinase do VEGFR-1 mas que mantenham o domínio extracelular de ligação ao ligando e o segmento transmembranar são viáveis, demonstrando assim a importância do sequestro do ligando na função deste recetor (VEGFR-1) (14).

A ligação do VEGF a este receptor permitiu ainda concluir que este induz a atividade da SHP-1 fosfatase que, por sua vez, reduz os níveis de fosforilação do VEGFR-2 (15). Estas informações suportam assim o papel regulador que o VEGFR-1 tem sobre o VEGFR-2 o que pode ter implicações no direcionamento da terapia VEGF sobre os tumores.

Como já referido anteriormente o VEGFR-2 é o mediador predominante da sinalização angiogénica induzida por VEGF's. Este é passível de ligação a todos os mediadores VEGF's embora possua menos afinidade para os VEGF's do que o VEGFR-1 que tem uma atividade cinática maior. A expressão de VEGFR-2 por macrófagos demonstrou mediar a infiltração de macrófagos em animais portadores de tumores (16). Ratos VEGFR-2 nulo revelaram-se letais entre o dia 8,5 a 9,5. Estes apresentam defeitos severos no desenvolvimento celular endotelial e hematopoiético sem organização dos vasos sanguíneos no embrião desenvolvido (17).

VEGFR-3 liga tanto o mediador VEGF-C e D encontra-se predominantemente na superfície do endotélio linfático e tem funções na remodelação do plexo capilar primário no embrião, com papel demonstrado na angiogénese e linfoangiogénese no adulto (18-20). Ratos VEGFR-3 nulos revelaram letalidade embrionária ao dia 9,5, apresentando falha cardiovascular resultado de uma estruturação e organização anormal dos grandes vasos com consequências no lúmen dos vasos e acumulação de fluido no interior da cavidade pericárdica (21).

As anormalidades registadas nos estudos acima mencionados sugerem que este recetor tem funções primeiramente associadas ao desenvolvimento do sistema cardiovascular e na vasculatura linfática em adultos (22). Assim o VEGFR-3 e os seus ligandos (VEGF-C/D) por apresentarem uma sinalização molecular forte entre eles para a linfoangiogénese nos tumores apresentam-se como outro possível caminho para uma terapêutica anti-angiogénica e anti-metastática.

Terapêutica inibitória dos VEGF's na terapia anti-tumoral

Os mediadores VEGF's e os seus receptores tem um papel central no processo angiogénico. A inibição dos processos angiogénicos desencadeados por estes é assim de grande importância e tem sido o grande foco de interesse visto que, 60% dos tumores malignos expressam altas concentrações de VEGF's.

Assim que os tumores crescem para lá de um certo tamanho a simples difusão de oxigénio e nutrientes torna-se insuficiente, necessitando de um maior aporte de sangue para suprir as necessidades crescentes. Assim, seria de supor que travando a angiogénese o tumor diminuiria e na melhor das hipóteses desapareceria por falta de oxigénio e nutrientes. Sugeriu-se assim que a inibição dos VEGF's teria uma maior eficácia numa fase precoce da doença. Contudo, devido à habilidade dos VEGF's para regular a permeabilidade dos vasos sanguíneos seria também de esperar que a sua inibição poderia ainda diminuir a formação de fluido ascítico e o edema observado em tumores com vascularização já estabelecida (23-24). A confirmação desta hipótese surgiu através de estudos DCE-MRI de tumores tratados com dois inibidores de VEGFR Vatalanib e Bevacizumab.

Assim, as estratégias para inibição da cascata de sinalização do VEGF incluem anticorpos direcionados contra VEGF ou VEGFR, análogos solúveis dos VEGFR (VEGF-trap) e inibidores de tirosina-cinase. Uma das primeiras estratégias para inibir a atividade dos VEGF envolveu o uso de anticorpos estritamente direcionados contra os recetores VEGF.

Dados pré-clínicos acerca de anticorpos anti-VEGFR-2 demonstraram diminuição na sinalização induzido pelos VEGF, diminuição da angiogénese e diminuição no crescimento, tanto primário como metastático numa variedade de sistemas tumorais (25). Como o VEGFR-2 é considerado geralmente o mais importante transdutor do sinal angiogénico dependente dos VEGF's representa assim um alvo primário no que diz respeito à terapia anti-angiogénica. O sucesso deste tipo de terapia apesar de ter obtido resultados positivos não foi de encontro ao esperado, variando esse sucesso de acordo com o tipo de cancro e consoante o estadio da doença (metastático, adjuvante, neoadjuvante). Como tal tem sido feito estudos tendo em conta o estadio do tumor para avaliar a sua eficácia consoante este.

Terapêutica usando anticorpos monoclonais

Bevacizumab

Avastin® ou bevacizumab foi o primeiro fármaco aprovado pela FDA desenhado para bloquear a formação de novos vasos sanguíneos em tumores. Foi desenvolvido pela Genentech e aprovado em 2004, com indicação para o cancro do colórectal metastático quando usado em concomitância com quimioterapia como tratamento de primeira linha e usado em segunda linha em conjunto com tratamento quimioterapia baseado no 5-

fluoruracilo. Trata-se de anticorpo monoclonal humanizado do tipo IgG direcionado contra VEGF's, que atua bloqueando a ligação do VEGF, ao seu respectivo recetor, retardando o tempo que a doença leva a progredir em pacientes que sofram de cancro metastático das células renais e de cancro do pulmão das não pequenas células.

Bevacizumab foi desenvolvido para inibir os VEGF's e através destes causar destruição da rede de vasos sanguíneos que nutre as células cancerígenas, tendo em vista o retardar do crescimento tumoral. Esta molécula apresenta as mesmas propriedades bioquímicas e farmacológicas que um anticorpo natural, mas com reduzida imunogenicidade e um tempo de semi-vida aumentado. Está aprovado para o tratamento do glioblastoma, para o tratamento do mRCC como primeira linha ou segunda quando usado com quimioterapia standartizada de 5-fluorucilo, Non-small-cell-lung-cancer em combinação com carboplatina e paclitaxel, está aprovado para tratar advanced nonsquamous NSCLC e usado com interferon alfa para cancro metastico do rim. A toxicidade mais comum associada ao uso de bevacizumab incluem hipertensão, proteinúria, episódios hemorrágicos, eventos trombóticos, dificuldades na cicatrização e podem também ser encontrados casos de coágulos arteriais que podem levar a quadros mais graves como enfartes ou ataque cardíacos.

Aflibercept (VEGF Trap)

Aflibercept com o nome comercial Zaltrap[®] é um falso recetor solúvel para os VEGF's. A molécula liga-se ao VEGF-A antes que possa chegar aos seus receptores naturais (25). Consiste de uma proteína de fusão recombinante constituída pelos domínios de ligação VEGFR-1 e VEGFR-2 e a região Fc do anticorpo humano IgG. É um potente inibidor da angiogénese e liga-se ao VEGF-A 1000 vezes mais fortemente a este que os anticorpos monoclonais e inativa todas as isoformas do VEGF-A sejam elas circulantes ou teciduais inativando também PLGF e o VEGF-B.

O bloqueio da angiogénese provocado por este, poderá ser maior do que aquele conseguido com outras moléculas, tais como anticorpos monoclonais dirigidos contra os recetores VEGF. O aflibercept tem uma semi-vida relativamente longa, de aproximadamente duas semanas. Os resultados dos ensaios clínicos indicam que o sucesso clínico do aflibercept pode depender de um tratamento prolongado e de uma terapia combinada focada simultaneamente na inibição da angiogénese e na invasão tumoral (26).

Este foi aprovado pela FDA para o tratamento do cancro colonrectal metastático em combinação com 5-fluorouracil, leucovorina, irinotecano, em agosto de 2012, com o nome comercial de Zaltrap[®].

Aflibercept atua como um falso recetor solúvel que se liga ao VEGF-A, com uma maior afinidade do que os seus recetores nativos, bem como aos ligandos relacionados PIGF e VEGF-B. Atuando como uma armadilha para o ligando, o aflibercept previne a ligação dos ligandos endógenos aos seus recetores respectivos e assim bloqueia a sinalização mediada pelo recetor.

Os efeitos secundários associados ao seu uso são vários desde leucopenia, diarreia, neutropenia, proteinúria, aumento da AST, estomatite, fadiga, trombocitopenia ao aumento da ALT, hipertensão, perda de peso, diminuição do apetite, epistaxe, dor abdominal, disfonia, creatinina no soro aumentada, e dor de cabeça.

Inibidores da Tirosina-Cinase

Sunitib

Comercializado sob o nome de Sutent[®] é uma pequena molécula administrado por via oral, sendo um inibidor múltiplo dos recetores tirosina-cinase e tendo a sua estrutura baseada numa indolidona. Sunitib é usado como primeira escolha no tratamento de primeira linha do RCC. O sunitib inibe a sinalização celular referente angiogénese mediada por VEGF's por ser direcionado para múltiplos RTK's. Estes incluem PDGFR's e VEGFR's que têm um papel tanto na angiogénese tumoral como na proliferação de células tumorais. A inibição simultânea destes alvos leva em paralelo à reduzida vascularização do tumor e à morte das células cancerígenas e ultimamente à redução do tumor. Sunitib também inibe o KIT, factor das células estaminais, o RTK que quando impropriamente ativado devido à sua mutação leva à maioria dos GIST (27). Tem como indicação também um tipo de cancro pancreático conhecido como tumor pancreático neuroendocrino. A toma de sunitib poderá acarretar alguns efeitos secundários tais como fadiga, fraqueza, diarreia, boca seca, hipertensão, perda de apetite, dores de cabeça, tonturas e diminuição do ritmo cardíaco.

Sorafenib

Sorafenib com o nome comercial Nexavar® surge de uma colaboração entre a Onyx Pharmaceuticals que primeiramente desenvolveu a molécula e a Bayer que ajudou a complementar o seu desenvolvimento. Foi desenvolvido como um inibidor multiquinase que diminui a proliferação das células tumorais *in vitro*. Actua inibindo a actividade alvos presentes nas células tumorais (CRAF, BRAF, V600E BRAF, c-KIT e FLT-3) e na vasculatura tumoral (CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR-β). As RAF quinases são quinases serina/treonina, enquanto que c-KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3 e PDGFR-β são recetores quinase/tirosina. As Raf fazem parte do mecanismo oncogénico Ras, este é um gene que leva à divisão celular quando se encontra sobre-expresso, como acontece em diversos tumores incluindo RCC. Está indicado para o tratamento do carcinoma hepatocelular, carcinoma das células renais avançado que não apresentou resposta ao tratamento com interferon alfa ou interleucina-2, é ainda usado para tratar pacientes com carcinoma da tiroide diferenciado (papilar/folicular/células de Hürthle), localmente avançado ou metastático, em progressão, refratário ao iodo radioativo.

Toxicidade relacionada com o seu uso inclui rash, hand foot skin reaction, fadiga, diarreia e hipertensão (28,29).

Pazopanib

Pazopanib com o nome comercial de Votrient® está concebido para bloquear o crescimento de células tumorais de várias maneiras. Caracteriza-se por ser um inibidor da tirosina-cinase administrado na forma de sal hidrocloreídrico. Está indicado para o tratamento de primeira linha em adultos do carcinoma de células renais avançado. É também usado no tratamento de doentes adultos com subtipos seletivos de Sarcoma dos tecidos moles avançado, que tenham sido submetidos previamente a quimioterapia.

Trata-se de um inibidor potente múltiplo das tirosina-cinases (TKI) dos recetores do factor de crescimento endotelial vascular -1,-2, e -3, dos recetores do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR – α e β e do recetor do fator das células estaminais. Em estudos pré-clínicos, o pazopanib inibiu de forma dose-dependente a autofosforilação induzida por ligando dos recetores VEGFR-2, C-KIT e PDGFR-β em células cancerígenas. *In vivo* o pazopanib inibiu a fosforilação VEGF induzida do VEGFR-2 em pulmões de ratinho, angiogénese em modelos animais e o crescimento de múltiplos tumores xenograftos humanos em ratinhos.

No que diz respeito a toxicidade relacionada com o uso de pazopanib são frequentes os seguintes efeitos secundários diarreia, hipertensão, mudança da coloração capilar, níveis elevados de AST e ALT, níveis aumentados de bilirrubina, contagem baixa sanguínea para linfócitos e plaquetas e níveis de fosforo e sódio diminuídos bem como glucose aumentados.

Terapia anti-angiogénica no contexto metastático

Uma vez que a angiogénese é considerada necessária para o crescimento das metástases em todos os locais do corpo assumiu-se que os pacientes com tumores metastisados beneficiariam também deste tipo de terapia. Contudo os resultados foram variáveis, uma vez mais, variando consoante o tipo de tumor. Estes resultados variáveis sugeriram que, apesar de se encontrarem no mesmo estadio da doença continuava a haver tumores sensíveis à terapia e outros indiferentes a ela.

Inibidores da tirosina-cinase foram desenhados para inibir a sinalização dos recetores VEGF. No mRCC estes agentes demonstraram grande sucesso, com quatro agentes aprovados pela FDA para este estadio da doença, sorafenib, sanitib, pazopanib e oxitinib. Sorafenib foi o primeiro inibidor da tirosina-cinase a demonstrar efeito em mRCC durante um ensaio clínico de fase III. Os resultados traduziram-se num aumento em quase o dobro do PFS (5.5 vs 2.8 meses) e uma melhoria no OS foi também observada (30,31).

Bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado que se liga especificamente ao VEGF-A, demonstrou também ele eficácia em várias indicações dentro do estadio metastático. O primeiro ensaio de fase III publicado demonstrando a eficácia de um agente anti-angiogénico na clínica foi em mRCC onde a combinação de quimioterapia com bevacizumab apresentou resultados positivos tanto no PFS (10.6 vs 6.2 meses) como no OS (23. Vs 15.3 meses) comparado com a terapêutica apenas de quimioterapia (32).

Evidencias adicionais suportando a eficácia da terapia anti-angiogénica no cancro colorectal surgiram do estudo com aflibercept, uma nova proteína de fusão que se liga a três ligandos da família VEGF: VEGF-A, VEGF-B e PlGF. Inibindo também VEGF-B e PlGF que também se encontram implicados na angiogénese e na manutenção de vasos recém formados, aflibercept poderá assim ter efeitos anti-angiogénicos adicionais quando comparado ao bevacizumab que apenas tem como alvo VEGF-A (33-36).

A adição do aflibercept à quimioterapia mostrou um aumento tanto no PFS como no OS quando comparado com o tratamento, apenas com agentes quimioterapêuticos no mCRC (37). Além disso, uma separação das curvas de sobrevivência foi observada neste estudo, com um aumento na sobrevivência de 2 anos no grupo tratado com aflibercept quando comparado com o grupo de controle (37). Baseado nesta informação, o aflibercept foi recentemente aprovado para o tratamento do mCRC quando em combinação com quimioterapia. Curiosamente, apesar do benefício observado em terapias conjuntas de bevacizumab ou aflibercept com agentes quimioterapêuticos no mCRC, esforços para combinar agentes TKI com quimioterapia em mCRC provaram-se desapontantes em termos de aumento do OS (38-40).

Contudo, em contraste com alguns dados promissores, há imensos exemplos de tumores metastizados onde os agentes anti-angiogênicos falharam consistentemente em exercer um impacto significativo sobre o OS, podem incluir-se nesse lote cancro da mama, próstata, pâncreas e melanoma.

A terapia anti-angiogénica no tratamento de tumores metastáticos da mama tem interesse significativo. Em 2005 em estudos de fase III (AVF2119) demonstrou que a adição de bevacizumab ao capecitabine não originou resultados positivos, tanto no PFS como no OS (41).

No entanto em 2007, outro estudo de fase III (E2100) incluindo bevacizumab à terapia com paclitaxel acabou por demonstrar um aumento no PFS (11.8 vs 5.9 meses), mas não apresentou aumento no OS no tumor metastático da mama (42). Baseado nestes dados, a FDA acelerou a aprovação da combinação de bevacizumab com paclitaxel para o tratamento de tumor metastático da mama HER-2 negativo. Outros três estudos de fase III com bevacizumab associado à quimioterapia foram desenvolvidos para o mesmo tipo de cancro (AVADO, RIBBON-1 e RIBBON-2) e apesar de demonstrarem novamente uma extensão do PFS, os resultados para o OS revelaram-se mais uma vez desapontantes, não apresentando melhorias quando comparados com o tratamento usando apenas agentes quimioterapêuticos (43-45).

Tomando em consideração estes dados a FDA em 2010 decidiu revogar a licença do bevacizumab para esta indicação. A acrescentar a isto, resultados desencorajadores também foram observados com o uso de TKI no tumor da mama. Mas não só nos tumores da mama os resultados foram decepcionantes, também no adenocarcinoma da próstata (46) e cancro da próstata e tanto com o uso de bevacizumab como de aflibercept (47).

O porquê de alguns agentes anti angiogénicos mostrarem eficácia em alguns tumores metastáticos e noutros não, é atualmente desconhecida (48). Na base disto estarão importantes diferenças biológicas entre os tipos de cancro e poderão ser a base para estes resultados tão contrastantes obtidos com esta abordagem terapêutica.

Terapia anti-angiogenica no contexto adjuvante

O uso de agentes anti-angiogénicos neste contexto tumoral, baseia-se no princípio que após remoção cirúrgica do tumor primário a inibição da angiogénese pode impedir recidivas localizadas ou o crescimento de micrometastases tumorais.

Dois estudos de fase III no contexto adjuvante (NSABP-C08/AVANT) foram desenhados de maneira a poder comparar o OS em tumores do coloretal tratados apenas com quimioterapia durante 6 meses em grupo e quimioterapia em combinação com bevacizumab também durante o mesmo período de tempo, seguindo-se mais 6 meses de terapia de manutenção apenas com bevacizumab. Contudo não foram observadas diferenças significativas no OS quando avaliados durante um período de tempo de 3 e 5 anos (49,50).

Com provas dadas no contexto metastático em tumores do colonrectal o bevacizumab não conseguiu alcançar resultados encorajadores no contexto adjuvante. Estes resultados sugerem que mesmo em tumores onde os agentes anti-angiogénicos já deram provas de eficácia quando usados noutro contexto não mostram eficácia.

E, esta premissa não é só verdadeira para o bevacizumab, já que estudos revelam que seguindo o exemplo deste outros agentes anti angiogénicos demonstraram resultados desapontantes no cancro do coloretal. Assim, irinotecano, cetuximab e bevacizumab apesar de mostrarem resultados no contexto metastático, falharam em reproduzi-los no contexto adjuvante (49,51-53). As razões por detrás destes resultados não estão de todo esclarecidas, mas pensa-se prenderem-se com a biologia das micrometastases poder ser bastante diferente dos processos biológicos que ocorrem nos tumores metastáticos já estabelecidos e que isso tem consequências importantes para a resposta terapêutica registada.

Terapia anti-angiogénica no contexto neo-adjuvante

Teoricamente falando o uso de agentes anti-angiogénicos teria grande interesse e traria grandes vantagens no tratamento em tumores deste tipo de contexto cancerígeno.

Primariamente poderia ser usada para reduzir o tamanho do tumor, convertendo tumores não operáveis em tumores que fossem passíveis de operar e ainda seria de prever que o seu uso diminuiria as hipóteses tanto de recidivas como de metastização local. No entanto em ensaios clínicos randomizados demonstraram dados contraditórios, nomeadamente em pacientes com cancro da mama (54,55). Não sendo assim claro se o uso de terapia anti-angiogénica neste tipo de contexto traria benefícios aos doentes pois ainda não existem dados maturados sobre este contexto cancerígeno.

Entraves à terapia anti-angiogénica

A resistência à terapia anti-angiogénica tem sido uma das causas apontadas para os resultados variáveis obtidos na prática clínica no uso deste tipo de terapia. A resistência pode ser genericamente classificada como intrínseca, onde os tumores não apresentam resposta desde o início da terapêutica, e adquirida, onde os tumores apesar de apresentarem numa primeira fase resposta ao tratamento acabam por progredir independentemente de estarem a ser tratados.

Uma vez que a terapia anti-angiogénica visa atingir o tumor atuando na sua vasculatura, os mecanismos que determinam a sua sensibilidade ou resistência advém provavelmente de uma interação complexa entre as células tumorais e o estroma a que estão associadas.

Estudos efetuados em pacientes com mRCC têm vindo a revelar algumas informações sobre esta relação tumor-estroma no que diz respeito à resistência intrínseca. Quando examinados tumores que estejam a ser tratados com um único agente anti-angiogénico, estes demonstraram não só diferenças em termos de fluxo sanguíneo como também mudanças em relação à dimensão da lesão. Em alguns casos é possível observar uma forte resposta vascular ao tratamento que é acompanhada pela diminuição significativa do tumor (56,57). Tumores onde surja este tipo de resposta provavelmente possuem duas importantes condições: a) que o crescimento e manutenção da sua vasculatura é extremamente sensível ao tratamento e b) que sobrevivência das células tumorais está intimamente interligada com o seu suprimento vascular.

Num segundo cenário apesar da resposta vascular ser boa o crescimento tumoral é apenas estabilizado o que leva a crer que apesar da diminuição do aporte vascular as células tumorais sofreram um processo adaptativo de forma a conseguirem sobreviver no novo ambiente vascular. No entanto, há casos onde a resposta vascular à terapia é nula ou inexistente, resultando em poucas ou nenhuma alteração à progressão tumoral (56-58). Assim nos casos onde a terapia não se mostra eficaz, a resistência deverá advir de meios alternativos que o tumor poderá ter encontrado de forma a poder vascularizar-se e recorrendo a um tipo de vasculatura que seja insensível a terapêutica anti-VEGF instituída ou ainda a uma possível adaptação tumoral para que o seu crescimento e manutenção continue a ocorrer apesar do reduzido fluxo vascular (57). Algumas teorias surgiram para explicar esta resistência e o porquê deste tipo de terapia não atingir o seu pleno potencial.

Heterogeneidade da vasculatura tumoral

Como foi dito anteriormente a vasculatura tumoral apresenta grande heterogeneidade no que diz respeito à sua resposta à terapia anti-angiogénica, com alguma vasculatura a demonstrar sensibilidade e outra a apresentar uma forte resistência.

Em estudos pré-clínicos a terapia focada nos VEGF's foi capaz de suprimir eficazmente o crescimento de novos vasos tumorais, mas mostrou-se menos eficaz no que diz respeito à vasculatura já estabelecida (125-127).

Isto poderá ser explicado se pensarmos que os novos vasos tumorais recém-formados forem extremamente dependentes dos mediadores VEGF e à medida que estes vão maturando perdem essa dependência. Essa maturação poderá ocorrer através de diferentes processos, “levando à formação de até pelo menos seis diferentes tipos de vasos sanguíneos tumorais, variando quanto à sua sensibilidade para a terapia anti-VEGF” (60).

Ora, um dos aspetos da maturação dos vasos sanguíneos é o recrutamento de pericitos para os vasos tumorais. Processo este mediado por recetores de crescimento derivados das plaquetas.

Está demonstrado que a inibição do recrutamento de pericitos mediado pelo PDGF aumenta a eficácia da terapêutica anti-VEGF (62,63).

Muitos dos inibidores tirosina cinase anti VEGF usados hoje na prática clínica são potentes inibidores tanto dos VEGF's como também do PDGF inibindo assim o recrutamento pericitico. No entanto, foram recolhidos dados em modelos xenografos usando TKI que

apresentaram dados contraditórios. Tanto aumentando como diminuindo os níveis de cobertura efetuada pelos pericitos, dependendo do estudo em questão (64-67).

Assim, em vasos tumorais maduros que demonstrem resistência ao Anti-VEGF continuam a ser difíceis de tratar não apresentando respostas satisfatórias.

Mecanismos alternativos de sinalização pro-angiogénicos

Mesmo quando a sinalização VEGF está inibida o crescimento e manutenção de vasos sanguíneos pode ser estimulada através de outros meios de sinalização.

Estudos pré-clínicos conseguiram identificar vários candidatos capazes de induzir o crescimento e manutenção da vasculatura tumoral. Estes mesmos estudos provaram ainda, que a terapia simultaneamente focalizada nos sinalizadores VEGF's e em outros fatores de crescimento aumenta a resposta à terapêutica. Assim, terapias que visem múltiplos fatores de crescimento pró-angiogénicos poderão ser necessárias para alcançar uma supressão eficaz e duradoura da angiogénese tumoral e por conseguinte, o retardar ou parar o seu crescimento.

Existem ainda dados que comprovam que a presença de fatores circulantes (FGF2,HGF,PLGF) imediatamente antes da progressão da terapia anti-angiogénica, está relacionado como desenvolvimento de resistência a esta (68,69).

Contudo, está ainda por confirmar clinicamente que estas vias alternativas de sinalização pro-angiogénicas medeiam resistência a este tipo de terapia.

Apesar da maioria dos TKI usados na prática clínica visarem alvos múltiplos e conseguirem suprimir não só a sinalização mediada pelos VEGF mas também pelo FGF e PDGF, alguns tumores continuam a mostrar sinais de progressão mesmo durante o tratamento com estes TKI-multi-alvo.

Adaptação das células tumorais a condições de stress

Como ficou explicito durante todo este trabalho o objectivo da terapia anti-VEGF é reduzir o aporte de oxigénio e nutrientes ao tumor, suprimindo o seu crescimento. Contudo, trabalhos pré-clínicos demonstraram que as células tumorais mesmo privadas destes componentes, possuem a capacidade de se adaptarem e a este novo ambiente e sobreviverem nele.

Estes mecanismos de sobrevivência incluem uma resistência por parte das células tumorais à morte quando sob condições de stress. Isto poderá ser conseguido através de aberrações genéticas ocorridas nessas células como a perda da função do gene de supressão tumoral p53 (70,71).

Tumores tratados com terapia anti-angiogénica poderão adaptar-se, alterando o seu metabolismo e recorrendo a processos de autofagia (64,72-76). Pré-adaptação ou adaptação reativa podem assim desempenhar um papel fundamental em determinar se os tumores respondem ou não as terapias Anti-VEGF.

Mecanismos alternativos de vascularização tumoral

Apesar de ser comumente aceite que os tumores utilizam maioritariamente o crescimento angiogénico dependente dos VEGF, começa a ser cada vez mais aparente que a sua vascularização se dá através de diversos mecanismos incluindo crescimento microvascular (IMG), angiogénese glomeruloide, mimetismo vasculogénico, *looping* angiogénico, co-opção de vasos e intussuspecção (3,77,78).

IMG é um processo que gera dois novos vasos através da fissão de um vaso pré-existente, este fenómeno foi observado em melanoma primário humano e glioblastoma (79,80).

Angiogénese glomeruloide, resulta de ninhos apertados de vasos tumorais conhecidos como corpos glomeruloides. Estes corpos glomeruloides foram observados em diversos tipos de tumor incluindo glioblastoma, melanoma, tumores da mama, endométrio e próstata (81).

Na vasculogénese mimica, as células tumorais, as células organizam-se em estruturas tipo vasos que são irrigados através da sua ligação à vasculatura normal. Foi identificado este fenómeno em diversos tumores humanos como melanoma, mama, ovário próstata e sarcoma (82).

Estudos pré-clínicos recentes revelaram que as células estaminais tumorais podem ter capacidade de se diferenciar diretamente em células endoteliais ou em pericytes, que poderá ser o mecanismo usado para que ocorra este fenómeno angiogénico (83-85).

Na angiogénese em *loop*, os vasos são extraídos do tecido normal circundante pela ação de miofibroblastos contracteis arrastando-os para irrigarem o tumor (86). Embora este mecanismo só esteja bem caracterizado na cicatrização, é hipoteticamente possível que os tumores também se possam servir dele. É de mencionar que estes mecanismos alternativos

de angiogénese poderão ser independentes dos sinalizadores VEGF e por isso capazes de mediar a vascularização tumoral apesar da terapêutica Anti-VEGF.

Como exemplo, o crescimento microvascular intuspectivo foi demonstrado como um mecanismo que permite ao tumor escapar dos efeitos dos inibidores tirosina cinase num modelo pré-clínico de cancro da mama (87). Contudo, apesar de toda esta informação continuamos a entender pouco sobre os mecanismos moleculares que controlam estes fenómenos alternativos de vascularização tumoral.

Terapia anti-angiogénica e o futuro

A experiência clínica adquirida até hoje já demonstrou que a terapia anti-angiogénica é um recurso a ter em conta no combate ao cancro. No entanto, o seu total potencial está ainda por explorar, existindo ainda muitas incógnitas por desfazer e assim é necessário identificar o caminho que de futuro a terapia deve tomar para que se torne o mais eficaz possível. A compreensão acerca da biologia vascular tanto dos tumores primários como das suas metástases é um deles.

É necessário pensar que nem todos os tumores vascularizam da mesma forma, e embora não seja conhecido o porque desta heterogeneidade na vascularização é claro que esta heterogeneidade é importante na maneira como os tumores irão responder á terapêutica. Assim a evolução tumoral, bem como o ambiente no qual o tumor primário se origina irá muito provavelmente ter um papel importante na evolução da vascularização do tumor. A vasculatura não é uma identidade homogénea, existe uma heterogeneidade considerável de formas e funções que pode ser observada entre diferentes órgãos (88). Como diferentes tipos de tumores primários se desenvolvem em diferentes órgãos (cérebro, pele, rim, fígado, pulmão, etc) é possível que os mecanismo que desenvolvem, de maneira a poderem-se vascularizar, também sejam diferentes.

De maneira a poder desenvolver terapias anti-angiogénicas mais eficazes é necessário que ganhemos uma melhor compreensão da biologia vascular pertencente a cada tipo de tumor. A importância da sinalização VEGF nas diferentes fases da doença é também um assunto que interessa abordar. O facto de a mesma terapia demonstrar eficácia no contexto metastático para diversas indicações no contexto adjuvante está ainda por demonstrar. Essa eficácia pode ter importantes implicações na maneira como vemos e tratamos tumores em diferentes contextos. É assim necessário encarar que em metástases já estabelecidas a

angiogénese derivada da sinalização VEGF tem uma implicação maior que nas micrometastases, sendo necessário aprofundar os mecanismos que estão inerentes à vascularização de micrometastases de maneira a poder identificar e revelar o porquê das diferenças de resultados na terapia quando comparados com os resultados obtidos no tratamentos de metástases já estabelecidas.

Outro ponto a abordar é a vasculatura dos tumores primários ser diferente das suas metástases filhas, pois se assumirmos que o ambiente do órgão tem uma profunda influência sobre os mecanismos que o tumor utiliza para gerar vasculatura então, devem existir diferenças entre as duas vasculaturas. As dificuldades encontradas por um tumor primário da mama referentes a sua vascularização, deverão ser diferentes daquelas apresentadas em outros ambientes como o pulmão, próstata ou cérebro. A suportar esta teoria está a ideia que a colonização metastática de novos órgãos é ineficiente e é necessário ao tumor adaptar-se a esse novo ambiente (89). Assim é de grande valor clínico entender completamente os processos angiogénicos utilizados tanto pelo tumor primário como das suas metástases em diferentes órgãos.

Outro factor de resistência reside na heterogeneidade dos tumores. Constatou-se que em doentes com múltiplas metástases, a resposta que estas tem à terapia anti-angiogénica varia, e podemos verificar que algumas das lesões vão responder à terapia enquanto outras vão continuar a progredir (57). Isto acaba por tornar-se complicado no que diz respeito a gestão da terapêutica ideal para o paciente e pode significar o fracasso desta precocemente. Embora a origem desta heterogeneidade seja ainda ambígua, a ideia dos processos biológicos vasculares distintos pode estar na base desta. Estudos histopatológicos em humanos incidindo sobre o pulmão e fígado revelaram que tumores presentes nestes locais mostram uma significativa heterogeneidade tumoral tanto intra como inter tumoral, utilizando tanto a angiogénese como a co-opção vascular para garantir acesso ao fornecimento vascular (90-97).

Estas informações sugerem que dentro do mesmo tumor e entre tumores diferentes no mesmo paciente, mais que um mecanismo poderá ser utilizado para os respectivos tumores vascularizarem. Análises genómicas aos tumores mostraram ainda diferenças significativas quer intra quer inter tumorais (89) esta diversidade genética poderá contribuir para a existência de diferentes mecanismos de vascularização a ter lugar no mesmo paciente. A compreensão de como esta heterogeneidade surge e a forma de como focá-la eficazmente é

um objetivo chave não só para a terapia anti-angiogénica mas para todas as terapias anti-tumorais (98,99).

Como podemos constatar a biologia inerente à resposta à terapia anti-angiogénica é complexa, bem como o próprio funcionamento molecular do tumor. É assim normal que a falta de biomarcadores preditivos para esta classe de agentes se mantenha sem avanços claros. Para identificar quais os pacientes irão beneficiar do uso deste tipo de agentes são necessários biomarcadores que possam ser associados aos mecanismos biológicos complexos que estão por detrás da vascularização tumoral. O mais importante na questão dos biomarcadores nem será a sua descoberta. Uma vez que, cada vez são encontrados novos biomarcadores mas sim a padronização de métodos de avaliação destes entre unidades de saúde de forma a poderem ser validados prospectivamente e utilizados na rotina terapêutica. No entanto não será de prever que o uso de um único biomarcador seja suficiente para prever a eficácia dos agentes anti-angiogénicos, especialmente em pacientes com múltiplas metástases, onde a aferição de apenas um único biomarcador não deve ser capaz de antecipar uma eficácia da terapia devido a heterogeneidade tumoral. No futuro será de prever que a decisão de utilizar um agente anti-angiogénico em particular tenha em conta diversos fatores incluindo: a) tipo de cancro; b) estadio e localização do tumor incluindo locais das metástases envolvidas; c) informação genética; d) marcadores circulantes tanto pré terapia como durante o seu decorrer; e) informação imagiológica tanto adquirida antes do início da terapia como durante o seu decorrer. Assim, atualmente, vários agentes estão disponíveis para o tratamento deste tipo de doença e é cada vez mais importante fazer uma escolha informada de modo a diminuir efeitos secundários e garantir uma maior eficácia possível.

Conclusão

O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão do estado atual da terapia anti-angiogénica e enquadrar o papel dos VEGF's neste tipo de terapia. O desenvolvimento deste tipo de terapia foi muito antecipada, uma vez que se pensou que iria contornar grande parte das resistências que tem sido associadas ao tratamento de tumores, por se focar na vasculatura tumoral e não no próprio tumor. Podemos dizer com base neste trabalho que é um campo que promete dar um grande contributo e que se trata de uma alternativa credível no combate ao cancro. O caminho percorrido desde a teorização por Judah Folkman, em meados da década de oitenta, de que os VEGF e a angiogénese podiam ser alvos fiáveis para a terapia anti-tumoral foi grande, existindo hoje em dia inúmeros fármacos anti-angiogénicos a ser usados na prática clínica. No entanto, há medida que vamos avançando e compreendemos melhor os mecanismos por detrás da angiogénese tumoral também novos desafios vão surgindo. Apesar de todos esses novos desafios a terapia anti-angiogénica associada à quimioterapia tem vindo a alcançar alguns sucessos, e apesar desses sucessos ainda há muito trabalho a ser desenvolvido de maneira a alcançar todo o potencial terapêutico que este tipo de abordagem encerra. Futuramente cada vez mais este tipo de terapia será de grande utilidade no combate ao cancro, e prevê-se que terapias cada vez mais personalizadas, tendo em conta o tipo de tumor e as suas especificidades estejam para surgir. É possível concluir que a investigação e o investimento até hoje feito nesta abordagem terapêutica não foram em vão e que abriam novos horizontes no que concerne a terapias alternativas de combate ao cancro.

Referências Bibliográficas

- (1) Naveen S. Vasudev, Andrew R. Reynolds - Anti-angiogenic therapy for cancer: current progresso, unresolved questions and future directions. *Epub* (2014); 17:471-494.
- (2) Carmeliet P, Jain RK - Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* (2011); 473(7347):298-307.
- (3) Leite De Oliveira R, Hamm A, Mazzone M - Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol Aspects Med* (2011); 32(2):71-87.
- (4) Ellis LM, Hicklin DJ - VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* (2008); 8(8):579-591.
- (5) De VC, Escobedo Ja, Ueno H. The Fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* (1992); 255: 989-991.
- (6) Afuwape Ao, Kiriakidis S, Paleolog EM. The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol.* (2003); 17(3): 961-972.
- (7) Aase K, von Euler G, Li X, Ponten A, Thoren P, Cao R, et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* (2001); 104:358-64.
- (8) Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping binding sites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia. *Circ Res* (1999); 85:992-9.
- (9) Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* (2004); 5:74-80.
- (10) Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* (2005); 25:2441-9.
- (11) Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* (2001); 7:575-83.
- (12) Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* (1994); 269:26988-95.

- (13) Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assemble of vascular endothelium. *Nature* (1995);376:66-70.
- (14) Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is suficiente for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998); 95:9349-54.
- (15) Nozaki M, Sakurai E, Raisler BJ, Baffi JZ, Wittta J, Ogura Y, et al. Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A. *J Clin Invest* (2006); 116:422-9.
- (16) Dineen SP, Lynn KD, Holloway SE, Miller AF, Sullivan JP, Shames DS, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 mediates macrophage infiltration into orthotopic pancreatic tumors in mice. *Cancer Res* (2008);68:4340-6.
- (17) Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* (1995); 376:62-6.
- (18) Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, et al. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 1992; 52:5738-43.
- (19) Galland F, Karamysheva A, Pebusque MJ, Borg JP, Rottapel R, Dubreuil P, et al. The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene* (1993);8:1233-40.
- (20) Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995); 92:3566-70.
- (21) Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* (1998); 282:946-9.
- (22) Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev in Oncol Hematol* 2007; 62:179-213.
- (23) Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410.
- (24) Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 1972; 175: 409-419.

- (25) Clarke S, Sharma R. Angiogenesis inhibitors in cancer – mechanisms of action. *Aust Prescr.* 2006; 29: 9-12.
- (26) Gomez-Manzano C, Holash J, Fueyo J, Xu J, Conrad C, Aldape K, Groot J, Bekele J, Yung W. VEGF Trap induces antiglioma effect at different stages of disease. *Neuro Oncol.* 2008; 10(6): 940-945.
- (27) Hartmann JT, Kanz L. Sunitinib and periodic hair depigmentation due to temporary c-KIT inhibition. *Arch Dermatol.* 2008; 144(11): 1525-1526.
- (28) Eisen T, Ahmad M, Gore E. Phase I trial of BAY 43-9006 (sorafenib) combined with dacarbazine (DTIC) in metastatic melanoma patients. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol.* 2005; 23:7508.
- (29) Siu LL, Awada A, Takimoto CH. Phase I trial of sorafenib and gemcitabine in advanced solid tumors with an expanded cohort in advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 144-151.
- (30) Escudier B et al (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal cell carcinoma. *N Engl J Med* 356(2):125-134.
- (31) Escudier B et al (2009) Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol* 27(20):3312-3318.
- (32) Hurwitz H et al (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350(23):2335-2342.
- (33) Fischer C et al (2008) FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 8(12):942-956.
- (34) Li X et al (2009) VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr* 3(4):322-327.
- (35) Zhang F et al (2009) VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(15):6152-6157.
- (36) Fischer C et al (2007) Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)- inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 131(3):463-475.
- (37) Van Cutsem E et al (2012) 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* 30(28):3499-3506.

- (38) Carrato A et al (2013) Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus either sunitinib or placebo in metastatic colorectal cancer: a randomized, phase III trial. *J Clin Oncol* 31(10):1341-1347.
- (39) Hecht JR et al (2011) Randomized, placebo-controlled, phase III study of first-line oxaliplatin-based chemotherapy plus PTK787/ZK 222584, an oral vascular endothelial growth factor receptor inhibitor, in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 29(15):1997-2003.
- (40) Van Cutsem E et al (2011) Randomized, placebo-controlled, phase III study of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without PTK787/ZK 222584 in patients with previously treated metastatic colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 29(15):2004-2010.
- (41) Miller KD et al (2005) Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23(4):792-799.
- (42) Miller K et al (2007) Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 357(26):2666-2676.
- (43) Miles DW et al (2010) Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the firstline treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 28(20):3239-3247.
- (44) Robert NJ et al (2011) 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* 29(10):1252-1260.
- (45) Brufsky AM et al (2011) RIBBON-2: a randomized, doubleblind, 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* 29(32):4286-4293.
- (46) Kindler HL et al (2010) 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* 28(22):3617-3622.
- (47) Tannock IF et al (2013) Aflibercept versus placebo in combination with docetaxel and prednisone for treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer (VENICE): a phase 3, double-blind randomised trial. *Lancet Oncol* 14(8):760-768.

- (48) Ebos JM, Kerbel RS (2011) Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol* 8(4):210-221.
- (49) de Gramont A et al (2012) Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 13(12):1225-1233.
- (50) Cameron D, et al. (2012) Primary results of BEATRICE, a randomized phase III trial evaluating adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS), (Abstract S6-5).
- (51) Allegra CJ et al (2013) Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J Clin Oncol* 31(3):359-364.
- (52) Alberts SR et al (2012) Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA* 307(13):1383-1393.
- (53) Van Cutsem E et al (2009) Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol* 27(19):3117-3125.
- (54) Bear HD et al (2012) Bevacizumab added to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *N Engl J Med* 366(4):310-320.
- (55) von Minckwitz G et al (2012) Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med* 366(4):299-309.
- (56) Smith AD et al (2010) Morphology, Attenuation, Size, and Structure (MASS) criteria: assessing response and predicting clinical outcome in metastatic renal cell carcinoma on antiangiogenic targeted therapy. *AJR Am J Roentgenol* 194(6): 1470-1478.
- (57) Vasudev NS et al (2013) Changes in tumour vessel density upon treatment with anti-angiogenic agents: relationship with response and resistance to therapy. *Br J Cancer* 109(5):1230-1242.
- (58) Smith AD, Lieber ML, Shah SN (2010) Assessing tumor response and detecting recurrence in metastatic renal cell carcinoma on targeted therapy: importance of size and attenuation on contrast-enhanced CT. *AJR Am J Roentgenol* 194(1): 157-165.
- (59) Bergers G, Hanahan D (2008) Modes of resistance to antiangiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8(8):592-603.
- (60) Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF (2012) Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. *Cancer Res* 72(8): 1909-1914.

- (61) Helfrich I et al (2010) Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *J Exp Med* 207(3):491-503.
- (62) Bergers G et al (2003) Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111(9):1287-1295.
- (63) Erber R et al (2004) Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* 18(2):338-340.
- (64) Welte JC et al (2012) Contrasting effects of sunitinib within in vivo models of metastasis. *Angiogenesis* 15(4):623-641.
- (65) Tong RT et al (2004) Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* 64(11):3731-3736.
- (66) Shaheen RM et al (2001) Tyrosine kinase inhibition of multiple angiogenic growth factor receptors improves survival in mice bearing colon cancer liver metastases by inhibition of endothelial cell survival mechanisms. *Cancer Res* 61(4):1464-1468.
- (67) Winkler F et al (2004) Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6(6):553-563.
- (68) Kopetz S et al (2010) 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* 28(3):453-459.
- (69) Porta C et al (2012) Changes in circulating pro-angiogenic cytokines, other than VEGF, before progression to sunitinib therapy in advanced renal cell carcinoma patients. *Oncology* 84(2):115-122.
- (70) Yu JL et al (2002) Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 295(5559):1526-1528.
- (71) Yu JL et al (2001) Heterogeneous vascular dependence of tumor cell populations. *Am J Pathol* 158(4):1325-1334.
- (72) McIntyre A et al (2012) Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. *Clin Cancer Res* 18(11):3100-3111.
- (73) Nardo G et al (2011) Glycolytic phenotype and AMP kinase modify the pathologic response of tumor xenografts to VEGF neutralization. *Cancer Res* 71(12):4214-4225.

- (74) Hu YL et al (2012) Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res* 72(7):1773-1783.
- (75) Rapisarda A, Melillo G (2012) Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. *Nat Rev Clin Oncol* 9(7):378-390.
- (76) Xu J et al (2013) Colorectal cancer cells refractory to anti-VEGF treatment are vulnerable to glycolytic blockade due to persistente impairment of mitochondria. *Mol Cancer Ther* 12(5):717-724.
- (77) Sternberg CN et al (2010) Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 28(6):1061-1068.
- (78) Dome B et al (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170(1):1-15.
- (79) Ribatti D et al (2005) Microvascular density, vascular endothelial growth factor immunoreactivity in tumor cells, vessel diameter and intussusceptive microvascular growth in primary melanoma. *Oncol Rep* 14(1):81-84.
- (80) Nico B et al (2010) Intussusceptive microvascular growth in human glioma. *Clin Exp Med* 10(2):93-98.
- (81) Straume O et al (2002) Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res* 62(23):6808-6811.
- (82) Folberg R, Maniotis AJ (2004) Vasculogenic mimicry. *APMIS* 112(7-8):508-525.
- (83) Wang R et al (2010) Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468(7325):829-833.
- (84) Ricci-Vitiani L et al (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468(7325):824-828.
- (85) Cheng L et al (2013) Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153(1):139-152.
- (86) Kilarski WW et al (2009) Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nat Med* 15(6):657-664.
- (87) Joyce JA, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9(4):239-252.
- (88) Langenkamp E, Molema G (2009) Microvascular endothelial cell heterogeneity: general concepts and pharmacological consequences for anti-angiogenic therapy of cancer. *Cell Tissue Res* 335(1):205-222.

- (89) Luzzi KJ et al (1998) Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153(3):865-873.
- (90) Donnem T et al (2013) Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Med* 2(4):427-436.
- (91) Pezzella F et al (1997) Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 151(5):1417-1423.
- (92) Yousem SA (2009) Peripheral squamous cell carcinoma of lung: patterns of growth with particular focus on airspace filling. *Hum Pathol* 40(6):861-867.
- (93) Sardari Nia P et al (2007) Distinct angiogenic and non-angiogenic growth patterns of lung metastases from renal cell carcinoma. *Histopathology* 51(3):354-361.
- (94) Vermeulen PB et al (2001) Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol* 195(3):336-342.
- (95) Stessels F et al (2004) Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a nonangiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. *Br J Cancer* 90(7):1429-1436.
- (96) Van den Eynden GG et al (2012) The histological growth pattern of colorectal cancer liver metastases has prognostic value. *Clin Exp Metastasis* 29(6):541-549.
- (97) Van den Eynden GG et al (2013) The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res* 73(7):2031-2043.
- (98) Yap TA et al (2012) Intratumor heterogeneity: seeing the wood the trees. *Sci Transl Med* 4(127):127ps10.
- (99) Turner NC, Reis-Filho JS (2012) Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol* 13(4):e178-185.