

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza:
06/E1 CHIRURGIA CARDIO-TORACO-VASCOLARE

Settore Scientifico disciplinare:
MED/21 CHIRURGIA TORACICA

TITOLO TESI

**CARCINOMA POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE
T1aN0M0: RUOLO PROGNOSTICO
DELLA MICROVESSEL DENSITY**

Presentata da: Fabio Davoli

**Coordinatore Dottorato:
Prof. Andrea Stella**

**Relatore:
Prof. Franco Stella**

Esame finale anno 2014

Indice.

	Pag.
1. Introduzione.	3
2. Angiogenesi: definizioni, markers, cenni storici.	5
Processo angiogenico fisiologico e patologico.	5
Metodi di valutazione dell'angiogenesi in vivo ed in vitro.	7
Storia dei progressi nello studio dell'angiogenesi.	10
3. CD31: caratteristiche e impiego clinico.	11
Caratteristiche bio-molecolari.	11
Utilizzo previsto.	12
Impiego clinico.	13
4. Microvessel density: ruolo prognostico nelle neoplasie polmonari.	15
5. Criteri di selezione dei pazienti.	19
6. Metodologia immunoistochimica.	23
Allestimento dei preparati.	23
Determinazione della MVD (metodica di conteggio).	25
7. Follow-up.	28
8. Metodologia dell'analisi statistica.	29
9. Risultati.	30
Caratteristiche clinico-patologiche.	30
Analisi prognostica. Univariata /multivariata.	33
Analisi prognostica dei sottogruppi.	34
Curve di Kaplan-Meier	36
10. Discussione e conclusioni.	38
11. Bibliografia.	45

1. Introduzione.

L'angiogenesi è un processo fondamentale nella progressione locale e nella diffusione a distanza del cancro polmonare e dei tumori solidi.

Il nostro campo di interesse riguarda quanto il processo angiogenico, stimato mediante la determinazione della Microvessel density (MVD), influenzi la sopravvivenza a lungo termine e la diffusione a distanza del carcinoma polmonare non a piccole cellule in stadio IA pT1aN0M0, trattato chirurgicamente con successo.

Secondo l'ultima revisione del TNM del cancro polmonare, lo stadio pT1aN0M0 è lo stadio più precoce di diagnosi e definisce il nodulo polmonare neoplastico di dimensioni inferiori ai 2 cm di diametro in assenza di metastasi linfonodali e/o a distanza.

Il ruolo dell'angiogenesi nei tumori polmonari di piccole dimensioni è ancora oggetto di studio. Nel corso degli anni sono stati proposti vari parametri quantitativi e markers biologici per descrivere l'angiogenesi tumorale dei tumori solidi: nel nostro studio, per quantificare la densità delle strutture vascolari nel tessuto tumorale abbiamo utilizzato tecniche immunoistochimiche mirate alla ricerca del marker endoteliale CD31.

L'obiettivo dello studio è quindi quello di identificare un valore soglia di MVD statisticamente significativo per il carcinoma polmonare pT1aN0M0 e valutarne l'effetto prognostico a lungo termine.

2. Angiogenesi: definizioni, markers, cenni storici.

Processo angiogenico fisiologico e patologico.

La crescita dei vasi può essere divisa in vasculogenesi e angiogenesi .

La vasculogenesi è la nascita e lo sviluppo dei vasi nella fase embriogenetica, dove le isole ematiche migrano verso gli organi e diventano vasi in situ ^[1]. La scoperta dei precursori delle cellule endoteliali nel sangue periferico adulto, che sono in grado di differenziarsi in cellule endoteliali in vitro e di partecipare all'angiogenesi in vivo ^[2] , ha dimostrato l'esistenza di una vasculogenesi post-natale ^[3].

L'angiogenesi, d'altra parte, è da considerarsi come la crescita di cellule endoteliali e la conseguente formazione di nuovi vasi dal letto vascolare pre-esistente ^[4].

Il processo così descritto è fisiologico e sotto stretto controllo, presente in condizioni quali, per esempio, la guarigione delle ferite, il ciclo mestruale e l'ovulazione ^[1].

E' stato ipotizzato che tale controllo sia il risultato del bilancio tra fattori stimolanti e inibitori dell'angiogenesi ^[5]. Recenti pubblicazioni discutono sull'esistenza o meno di un singolo evento che determini lo “switch angiogenico”, similmente a quanto avviene per oncogeni e geni oncosoppressori, responsabili della deregolamentazione delle proprietà angiogeniche delle cellule tumorali quando verso un continuum o “progressione angiogenica” (Rak et al. ^[6]).

In generale sono presenti forti evidenze che i tumori dipendano strettamente dall'angiogenesi ^[7]; si stima infatti che una progressione tumorale oltre un volume di circa 1-2 mm³ richieda un processo angiogenico.

Nei tumori, con progressione / mutazione verso un fenotipo angiogenico, il saldo netto è a favore dei fattori pro-angiogenici, mentre nelle situazioni fisiologiche “normali” e nei tumori benigni la quiescenza endoteliale è determinata dalla dominanza degli inibitori ^[5].

La risposta ad uno stimolo angiogenico determina una sequenza di eventi che esita nella formazione di nuovi vasi.

Volendo riassumere il processo angiogenico in un ordine di passaggi, potremmo enunciare questa sequenza:

- 1) svincolo dei periciti dalla superficie abluminale del capillare;
- 2) rilascio di proteasi come urochinasi, attivatore del plasminogeno, da parte delle stesse cellule endoteliali;
- 3) degradazione della matrice extracellulare (ECM);
- 4) migrazione delle cellule endoteliali e (probabilmente) la loro proliferazione;
- 5) allineamento delle cellule che migrano in formazioni tube-like;
- 6) anastomosi di queste formazioni tubo-simili e apertura del flusso sanguigno.

In sintesi l'angiogenesi richiede almeno tre fasi: degradazione della ECM , chemiotassi verso uno stimolo angiogenico e proliferazione di cellule endoteliali.

E' un processo multifattoriale complesso che coinvolge sia il tumore che lo stroma peritumorale circostante ^[4,8].

Metodi di valutazione dell'angiogenesi in vivo ed in vitro.

L'angiogenesi può essere valutata con molti saggi differenti in vivo, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo .

Esempi classici di studio in vivo per l'angiogenesi includono l'utilizzo della guancia marsupio del criceto ^[9] , la membrana corioallantoidea del pulcino (CAM) ^[10] e l'iride e la cornea avascolare della roditore ^[11].

Saggi più recenti in vivo analizzano l'angiogenesi mediante l'impianto sottocutaneo di varie sostanze , come ad esempio i modelli di impianto della spugna ^[12,13] i "Matrigel plugs" , o combinazioni di uno di questi sistemi come il modello Matrigel / Spugna ^[14].

Questi saggi in vivo sono utili nel chiarire il meccanismo d'azione di vari fattori angiogenici e inibitori dell'angiogenesi e potrebbero essere utile per testare farmaci anti-angiogenici prima della sperimentazione clinica.

In ambito clinico, l'analisi della Microvessel density intra-tumorale (MVD) nei tumori solidi con la tecnica descritta da Weidner et al. ^[15], con alto ingrandimento microscopio ottico su aree " hot- spot", evidenziate con marcatori specifici per le cellule endoteliali, come vWF, CD31 (o platelet derived endothelial cell adhesion molecole/PECAM-1) e CD34, sembra fornire informazioni prognostiche nei tumori

solidi, come il seno ^[16,17] la prostata ^[18], il retto, la laringe ^[19] e carcinomi del polmone ^[20,21].

Per quanto riguarda le neoplasie polmonari primitive le informazioni prognostiche sembrano essere state riscontrate indipendentemente da quale dei marcatori endoteliali sopra citati sia stato utilizzato ^[22]. Attualmente i marcatori endoteliali più utilizzati sono il CD34 e il CD31, dove Mert et al. hanno mostrato un hazard ratio di 1,99 in una revisione delle pubblicazioni sulla base dell'impatto prognostico della MVD nel tumore polmonare non a piccole cellule ^[22].

Diversi studi sono riusciti a dimostrare che la MVD è un significativo fattore prognostico ^[23-25]. Studi recenti suggeriscono la superiorità del CD105 sul CD34 come marcatore per l'angiogenesi ^[16,26,27].

Il gruppo di Wang & Kumar ha dimostrato che il CD105 risulta essere sovraespresso nei vasi sanguigni del tumore al seno rispetto ai vasi dei restanti tessuti non patologici ^[28].

Inoltre hanno dimostrato la iper-espressione del CD105 rispetto alle cellule endoteliali del tessuto cerebrale normale durante l'ictus ^[29].

Una ragione probabile dei risultati contrastanti può essere dovuta alla reattività di tali anticorpi anti-endoteliali, considerando il fatto che gli anticorpi pan-endoteliali, come anti-CD31 e anti-CD34, possano reagire non solo con vasi neoformati, ma anche con i vasi normali intrappolati all'interno del tessuto tumorale ^[26].

Altre ragioni probabili delle discrepanze potrebbero essere operatore-dipendente. Diversi ricercatori possono identificare diversi "hot spots" e quindi una varianza legata all'operatore potrebbe essere rilevata.

E' stato quindi proposto un sistema di quantificazione informatica automatica ^[30,31], per la stima della MVD, riducendo al minimo l'errore operatore dipendente, minimizzando i bias.

Altre tecniche nella determinazione dell'angiogenesi come la misurazione del flusso di sangue in vivo tramite Color-doppler, la tomografia ad emissione di positroni e la risonanza magnetica sono stati presi in esame ^[32].

Recenti acquisizioni nella capacità di misurare i fattori angiogenici nel siero e nel plasma dei pazienti neoplastici hanno portato a numerose pubblicazioni ^[33-36], compreso nel cancro del polmone ^[37-43].

Inoltre, l'instabilità genomica e l'eterogeneità delle cellule tumorali possono spiegare il diverso outcome dei pazienti con tumori nello stesso stadio patologico o clinico, e la loro risposta alla terapia antitumorale, che variano notevolmente.

Questo indica l'importanza di creare un profilo biologico-molecolare nei pazienti con cancro del polmone.

TABELLA 1. Storia dei progressi nello studio dell'angiogenesi.

1787	<i>Dr. John Hunter, Chirurgo Inglese, per primo utilizza il termine "angiogenesis" (crescita di nuovi vasi) per descrivere la crescita dei nuovi vasi nel corno delle renne</i> ^[44] .
1971	<i>Dr. Folkman ipotizza che la crescita delle neoplasie maligne dipenda dall'angiogenesi. La sua teoria, pubblicata sul New England Journal of Medicine, è inizialmente considerata come un'eresia dagli scienziati più famosi del suo tempo</i> ^[45] .
1975	<i>Il primo inibitore dell'angiogenesi è scoperto nella cartilagine da Brem</i> ^[46] .
1984	<i>Il primo fattore angiogenetico, il bFGF o Basic Fibroblast Growth Factor è purificato da Shing e Coll alla Harvard Medical School</i> ^[47] .
1989	<i>Uno dei più noti e studiati fattori angiogenetici, il VEGF o Vascular Endothelial Growth Factor è scoperto da Ferrara e Coll.</i> ^[48] <i>Risulta identico alla molecola chiamata VPF (Vascular Permeability Factor) scoperta nel 1983 da Senger e Coll.</i> ^[49] .
1992	<i>Il primo trial clinico sull'utilizzo di un farmaco anti-angiogenetico TNP-470 inizia nei pazienti affetti da neoplasia maligna</i> ^[50] .
1997	<i>O'Reilly e Coll. dimostra la quasi totale regressione di alcuni tumori maligni dopo ripetuti cicli di terapia antiangiogenetica utilizzando angiostatine ed endostatine</i> ^[51] .
1999	<i>Utilizzo massivo di farmaci antiangiogenetici nei trials clinici.</i>
2003	<i>L'anticorpo monoclonale Avastin (Bevacizumab) diventa il primo farmaco antiangiogenetico utilizzato su larga scala nei trial clinici, dimostrata la sua effettiva efficacia nell'inibizione della crescita dei vasi tumorali con prolungamento nella sopravvivenza dei pazienti affetti da neoplasia polmonare</i> ^[52] .

3. CD31: caratteristiche e impiego clinico.

Caratteristiche bio-molecolari.

CD31 è una proteina transmembrana di tipo 1 a catena singola con massa molecolare di circa 135 kDa che appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline.

Nel siero umano sono state rilevate versioni diversamente legate di CD31, compresa una forma apparentemente priva di dominio transmembrana, ma che comprende la coda citoplasmatica ^[53].

CD31 si lega sia in modo omofilico che eterofilico. I leganti eterofilici comprendono i glicosaminoglicani del solfato di eparano, l'eparina e l'integrina $\alpha v\beta 3$. CD31 svolge un ruolo nelle interazioni adesive tra cellule endoteliali adiacenti, nonché tra leucociti e cellule endoteliali.

La legatura di CD31 alle superfici dei leucociti si traduce nell'aumento delle integrine dei leucociti funzionali e nella diapedesi attraverso l'endotelio, che comporta interazioni omofile di CD31. Inoltre, l'interazione eterofilica di CD31 ha un ruolo separato nella migrazione dei monociti attraverso la lamina basale subendoteliale ^[53].

CD31 si esprime in tutti gli endoteli continui, compresi quelli di arterie, arteriole, venule, vene e capillari non sinusoidali, ma non si esprime sull'endotelio discontinuo, per esempio nella polpa rossa splenica. Inoltre, CD31 si esprime diffusamente sulle superfici di megacariociti, piastrine, cellule mieloidi, cellule natural killer ed alcuni

sottoinsiemi di linfociti T, nonché sui precursori dei linfociti B ^[53]. Il sinonimo dell'antigene è PECAM-1, ovvero “molecola 1 di adesione di piastrine/cellule endoteliali”.

Utilizzo previsto.

L'utilizzo previsto è per uso diagnostico in vitro.

Il Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell, Clone JC70A (utilizzato in questo studio) , è destinato per essere utilizzato nell'immunoistochimica.

Questo anticorpo marca principalmente le cellule endoteliali ed è utile per l'identificazione dei disturbi vascolari benigni e maligni, compresi gli angiosarcomi ^[54,55]. E' prezioso per la marcatura dei vasi quando si determina l'angiogenesi in vari tipi di tumori ^[18,21,56].

L'interpretazione clinica di un'eventuale colorazione o della sua assenza deve essere integrata mediante studi morfologici avvalendosi di controlli adeguati e deve essere valutata nell'ambito dell'anamnesi del paziente e di altri test diagnostici da parte di un patologo qualificato.

L'anticorpo può essere utilizzato per marcare sezioni di tessuto fissate in formalina, incluse in paraffina. I campioni di tessuto devono essere tagliati in sezioni di approssimativamente 4 µm. Nelle cellule marcate dall'anticorpo è visibile prevalentemente una colorazione della membrana, con colorazione citoplasmatica più tenue.

Impiego clinico

Tessuti normali

L'anticorpo marca le cellule endoteliali in un'ampia gamma di tessuti, tra cui l'endotelio nei capillari glomerulari renali e l'endotelio dei vasa vasorum. Inoltre, l'anticorpo marca i megacariociti e, occasionalmente, cellule plasmatiche nel midollo osseo ^[54]. Nel colon, le cellule endoteliali dei vasi di grandi dimensioni mostrano una reazione di colorazione da moderata a forte, mentre i linfociti B nella zona del mantello delle tonsille mostrano una reazione di colorazione da debole a moderata.

Tessuti patologici

L'anticorpo marca le cellule endoteliali in una varietà di lesioni vascolari benigne e maligne. In 10 angiosarcomi su 10 (Parums e Coll, 1990 ^[54]) ed in 6 angiosarcomi su 7 (DeYoung e Coll, 1995 ^[55]), rispettivamente, l'anticorpo ha marcato cellule endoteliali vascolari maligne.

Negli studi precedentemente citati, l'anticorpo ha marcato inoltre 17 emangiomi su 17 ^[55] e 3 emangiomi su 3 ^[54].

Nei linfangiomi si sono osservati risultati discrepanti dal momento che è stato segnalato che l'anticorpo marca 8 casi su 8 ^[55] e 0 casi su 4 ^[54], rispettivamente.

Analogo discorso vale per i tumori glomici, dove 2 casi su 2 ^[54] e 0 casi su 7 ^[55] sono stati marcati dall'anticorpo.

Non è stata osservata marcatura in nessun caso di cisti linfoepiteliale e pneumatosi coli ^[54]; sono risultati negativi anche 30 neurilemmomi benigni e 4 maligni, 11 dermatofibromi, 6 leiomiomi, 3 leiomiosarcomi, 3 fibroblastomi a cellule giganti ^[55], 52 rabdomiosarcomi, 16 tumori a piccole cellule rotonde, 11 neuroblastomi, 23 tumori di Wilms, 20 retinoblastomi, 13 estensioneuroblastomi, e 7 linfomi maligni.

Inoltre, l'anticorpo ha marcato cellule endoteliali in tessuti tumorali con angiogenesi in studi sul cancro del polmone, del colon-retto e della mammella ^[18,21,56].

4. Microvessel density: ruolo prognostico nelle neoplasie polmonari.

La Microvessel density (MVD) o densità microvasale è stata spesso valutata per quantificare l'attività angiogenica tumorale ^[22,57]. Possiamo definirla come un marker dell'attività angiogenica del tessuto tumorale.

E' un parametro quantitativo che si avvale di diverse metodiche di quantificazione e conteggio; non presenta valori soglia e scale quantitative assolute, in quanto il conteggio può variare a seconda della metodica utilizzata e dell'anticorpo prescelto.

I vasi intra-tumorali e linfatici possono essere infatti studiati mediante saggio immunostochimico mirato al rilevamento di specifici markers endoteliali come CD31, CD34, D2-40/Podoplanin e Fattore VIII per quanto riguarda i vasi neoformati, il lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) per i linfatici.

Dopo l'analisi immunostochimica, il microscopio quantifica la densità microvasale ^[58-61] secondo vari protocolli di analisi. A questo proposito gioca un ruolo fondamentale l'esperienza dell'anatomo patologo esaminatore nell'interpretazione corretta dei risultati e nella scelta degli "hot spots" o aree a più intensa colorazione, oggetto del conteggio.

Vari studi hanno dimostrato un'associazione tra la MVD e l'outcome dei pazienti affetti da neoplasia polmonare non a piccole cellule ^[22,61-64] nonostante siano stati riportati numerosi conflitti e controversie ^[57,65].

In uno studio retrospettivo di 223 pazienti con tumore polmonare NSCLC operabile

(stadi IA-IIIa), si è dimostrato che una MVD elevata fosse un fattore prognostico significativo all'analisi univariata (hazard ratio [HR], 2.34; P $\frac{1}{4}$.0001) e multivariata (HR, 2.080; P $\frac{1}{4}$.039) ^[64].

A conferma di ciò una meta-analisi della letteratura pubblicata ha dimostrato che una conta elevata dei vasi intratumorali è un fattore prognostico negativo per il tumore polmonare NSCLC ^[22].

Tuttavia, lo studio di Han e coll. del 2001 ha trovato solo deboli evidenze circa la MVD come marker prognostico del tumore polmonare ^[63].

Questa variabilità può essere dovuta a differenze metodologiche, come l'anticorpo/marker utilizzato, la selezione delle sezioni da contare, il metodo stesso di conteggio ^[22,57,59].

A causa della mancanza di protocolli standard, si sono sviluppati vari dibattiti in merito all'utilizzo reale della MVD come misura dell'angiogenesi ^[59].

Una metodica meno invasiva sarebbe ottimale per esaminare l'angiogenesi durante il trattamento chemioterapico target ^[59].

A tale proposito sono di grande interesse lo sviluppo di markers radiologici di imaging ed esami ematici di laboratorio utili a monitorizzare la risposta antiangiogenica in corso di terapia ^[66,67].

All'interno di alcuni trials clinici si è ricorso alla Risonanza Magnetica o alla TC per valutare la risposta antiangiogenica di vari tumori solidi in trattamento, incluso il tumore polmonare non a piccole cellule ^[66,67]; si sta inoltre sviluppando un'altra tecnica per testare la perfusione neoplastica come la PET [H215O] ^[68].

Nel corso degli ultimi anni, la TC perfusionale ha dimostrato la riduzione dell'afflusso sanguigno nelle prime fasi dei trials di indagine dei farmaci antiangiogenici per il tumore polmonare non a piccole cellule; tuttavia, al momento, ci sono varie questioni riguardanti l'efficacia del monitoraggio delle tecniche di imaging in corso di terapia e di quanto possano effettivamente influenzare le decisioni cliniche.

In una review sistematica della letteratura del 2002 ^[22], che ha racchiuso tutti gli studi che comparavano l'outcome del tumore polmonare in rapporto all'attività angiogenica della neoplasia stessa, si è dimostrato che un'elevata MVD è un fattore prognostico negativo per la sopravvivenza dei pazienti trattati chirurgicamente; questo dato è risultato essere indipendentemente dal tipo di anticorpo utilizzato per la conta dei vasi. Questa osservazione è, a mio avviso, fondamentale non solo ai fini della stratificazione dei pazienti per le differenti terapie adiuvanti, ma anche per fornire una previsione alla risposta ai farmaci target.

L'altro punto fondamentale che emerge da questa review riguarda le discrepanze emerse in letteratura sui risultati dell'analisi metodologie utilizzate per quantificare la MVD.

Molte di queste discrepanze possono essere spiegate dai dettagli della metodologia che può influenzare il valore della MVD come indicatore prognostico, come ad esempio l'utilizzo dell'anticorpo (CD31, CD34 Fattore di von Willebrand) o se la MVD è stata quantificata alla periferia o al centro della neoplasia ^[69].

In accordo con il consenso internazionale, il CD31 è al momento l'anticorpo proposto per una quantificazione standard della MVD ^[70] e questa è una delle ragioni della scelta dell'utilizzo di questo anticorpo per questo studio.

A completamento, concludiamo che questa affermazione è valida per quanto riguarda la valutazione della MVD nel T del tumore primitivo; al contrario sono presenti criticità circa la stima della MVD nei linfonodi metastatici con il CD31, che può dare in alcuni casi dei falsi positivi ^[71].

5. Criteri di selezione dei pazienti.

L'analisi iniziale del database della U.O. di Chirurgia Toracica di Bologna, eseguita sulla base del database istituzionale 2002-2007, aveva in primis riguardato la selezione di 637 resezioni polmonari maggiori. Da queste sono state estratte 327 lobectomie, obiettivo della ricerca di pazienti portatori di neoplasia polmonare in stadio pT1aN0M0.

I pazienti che corrispondevano ai criteri di inclusione nello studio (neoplasia polmonare primitiva di diametro inferiore o uguale a 2 cm in assenza di metastasi linfonodali e/o a distanza, con decorso post-operatorio favorevole in assenza di maggiori comorbilità, istotipo carcinoma polmonare non a piccole cellule) non costituivano un campione numerico statisticamente soddisfacente (43 pazienti in totale, successivamente ridotti a 36 dopo una più attenta revisione dei dati a disposizione). In particolare i pazienti esclusi, dopo revisione anatomo-patologica, risultavano sottostadiati e/o portatori di micrometastasi linfonodali.

Il risultato non era inatteso.

Si consideri, infatti, che una esigua percentuale (circa il 12%) dei pazienti portatori di neoplasia polmonare si presenta all'osservazione clinica in stadio Ia, ma dal punto di vista prognostico il gruppo T1aN0M0 presenta i migliori dati di sopravvivenza, come dimostrato dall'ultima revisione del TNM proposta da Peter Goldstraw nel 2007 ed ora comunemente in uso ^[72].

TABELLA 2: Proporzioni dei differenti stadi T/N/M nel tumore del polmone non a piccole cellule.

T/M	N0	N1	N2	N3	TOTALE
T1a	1965	226	191	4	2386
T1b	1796	346	327	6	2472
T2a	3186	1123	905	18	5232
T2b	937	382	285	4	1608
T3	2188	1015	1114	74	4391
T4	224	118	217	12	571
M1a	99	42	94	4	239
M1b	15	7	11	5	38
TOTALE	10410	3256	3144	127	16937

Liberamente modificata da "The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. Journal of Thoracic Oncology: August 2007 - Volume 2 - Issue 8 - pp 706-714" Copyright © 2007 by the International Association for the Study of Lung Cancer."^[72]

Si tratta principalmente di noduli polmonari riscontrati occasionalmente, spesso peraltro sottostimati durante l'iter diagnostico-clinico. Recentemente la proporzione di questi pazienti è aumentata notevolmente nei centri che perfezionano tecniche di anticipazione diagnostica del cancro polmonare su larga scala, come ad esempio la TC Spirale nei soggetti a rischio (età>50 anni, fumatori, esposizione professionale positiva). Per questo i fattori prognostici che influenzano la sopravvivenza del tumore polmonare in stadio precoce sono di grande attualità.

Al termine del I anno di Dottorato di Ricerca ho deciso di estendere il database, coinvolgendo nell'analisi retrospettiva i pazienti della S.C.D.U. di Chirurgia Toracica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara.

Ho quindi analizzato retrospettivamente il database della S.C.D.U. di Chirurgia Toracica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara, inserendo nella ricerca i pazienti sottoposti a lobectomia polmonare in stadio Ia pT1aN0M0 dal gennaio 2002 al dicembre 2007 e selezionando inizialmente 50 pazienti idonei allo studio in atto.

La redazione multicentrica del nuovo database clinico di pazienti portatori di neoplasie polmonari non a piccole cellule in stadio Ia pT1aN0M0 ha portato il numero di pazienti in studio da 36 a, inizialmente, 86.

Dalla revisione del secondo database formulato sulla base dei dati provenienti dai due centri collaboratori dello studio, sono stati selezionati 82 pazienti trattati consecutivamente dal 2002 al 2007 con stadiazione patologica T1aN0M0.

Sono stati esclusi i pazienti deceduti durante la degenza post-operatoria per complicanze chirurgiche e/o complicanze mediche, al fine di stilare un universo campione il più omogeneo possibile mirato al follow-up oncologico; in particolare è stato escluso un paziente deceduto in seguito ad embolia polmonare massiva in V giornata post-operatoria.

E' stato inoltre escluso, per motivi di uniformità prognostica del campione, un paziente che all'analisi anatomico-patologica definitiva ha mostrato un tumore polmonare primitivo sincro a una metastasi polmonare da neoplasia uroteliale.

6. Metodologia immunoistochimica.

Allestimento dei preparati.

Sezioni rappresentative di ogni caso sono state tagliate al microtomo e fatte aderire a vetrini silanizzati (Histobond[®]). In particolare sono state scelte le inclusioni in paraffina in cui la neoplasia era maggiormente rappresentata.

Il procedimento immunoistochimico che è stato applicato ha previsto l'uso di due anticorpi di cui uno reattivo contro l'antigene di interesse (CD31, clone JC70, Cell Marque Corporation, USA) e il secondo che funge da legame e reagisce con un cromogeno (DAB o diaminobenzidina). Come controllo sono state allestite sezioni istologiche in cui è stato omesso l'anticorpo primario.

In dettaglio i vari passaggi:

- Le sezioni sono state sparaffinate con l'ausilio di LEICA ST5020 Multistainer con programma di sparaffinatura che prevede passaggio in forno a microonde che serve per aumentare l'adesione delle sezioni al vetrino, seguito da immersione in tre xiloli (Xilene SIGMA ALDRICH) e passaggio in tre alcoli a gradazione 100, 80, 70 (ISTOALCOOL 99% DIAPATH) e risciacquo successivo in acqua. La procedura ha una durata di circa 35 minuti.

- I vetrini idratati vengono lasciati sotto acqua corrente e viene portato ad ebollizione l'EDTA in forno a microonde (BIO-OPTICA) per lo smascheramento. I vetrini su supporto vengono quindi immersi nell'EDTA e smascherati in forno a microonde.

E' importante che il livello di EDTA non si abbassi mai al di sotto della superficie di vetrini altrimenti lo shock termico inficerà la correttezza della procedura; proprio per questo motivo il ciclo di 20 minuti circa viene spezzato in cinque periodi della durata rispettivamente di 6,4,4,3,3 minuti ad ogni intervallo è possibile aggiungere acqua distillata per mantenere il livello di EDTA.

- Una volta terminato lo smascheramento i vetrini sempre immersi nel tampone vanno lasciati a raffreddare sotto cappa. Il successivo passo prevede il montaggio degli istologici su DAKO[®] AUTOSTAINER dopo allestimento dei reagenti nelle dosi proposte dal programma di avviamento. I vetrini prima di iniziare il processo vengono lavati con PBS INVITROGEN[®] 0.9% e ad ogni step della reazione subiscono un trattamento sempre con soluzione tampone. La corsa consta di quattro reazioni:

- a) Trattamento con H₂O₂ al 3% per 5 minuti che ha il compito di inibire la perossidasi endogena.
- b) Incubazione con anticorpo monoclonale CD31 prediluito con DILUENT ANTIBODY VENTANA[®] per circa 60 minuti.
- c) Incubazione con ENVISION DUAL DAKO[®] anticorpo secondario per 30 minuti
- d) Incubazione con Diaminobenzidina (DAB) DAKO[®] REAL per 4 minuti.

- I vetrini vengono poi sciacquati in acqua corrente per 5 minuti per eliminare eventuali residui di DAB e anticorpo non legato.

In seguito vengono immersi in Ematossilina (MAYER'S EMATOXILIN DIAPATH[®]) per 6 minuti e in acqua per altri 5 minuti in modo da avere un completo viraggio.

- Vi è poi passaggio in alcool a intensità crescente 70, 80, 100 (3 minuti ad alcool) e successivo in 3 xiloli e montaggio dei vetrini.

I preparati così ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico (NIKON[®] Eclipse E 600).

Determinazione della MVD (metodica di conteggio).

Una volta terminata la procedura immunoistochimica, si è proceduto all'identificazione a piccolo ingrandimento delle 5 aree di maggiore intensità di colorazione o "hot spots".

Successivamente si è proceduto alla conta manuale dei vasi positivi alla colorazione immunoistochimica con CD31, presenti nelle 5 aree precedentemente selezionate ad ingrandimento 40x, ed alla media dei 5 conteggi assoluti, ottenendo un valore di MVD per $0,22 \text{ mm}^2$. Infine si è rapportato il valore trovato per ogni singolo paziente ad un'area di 1 mm^2 .

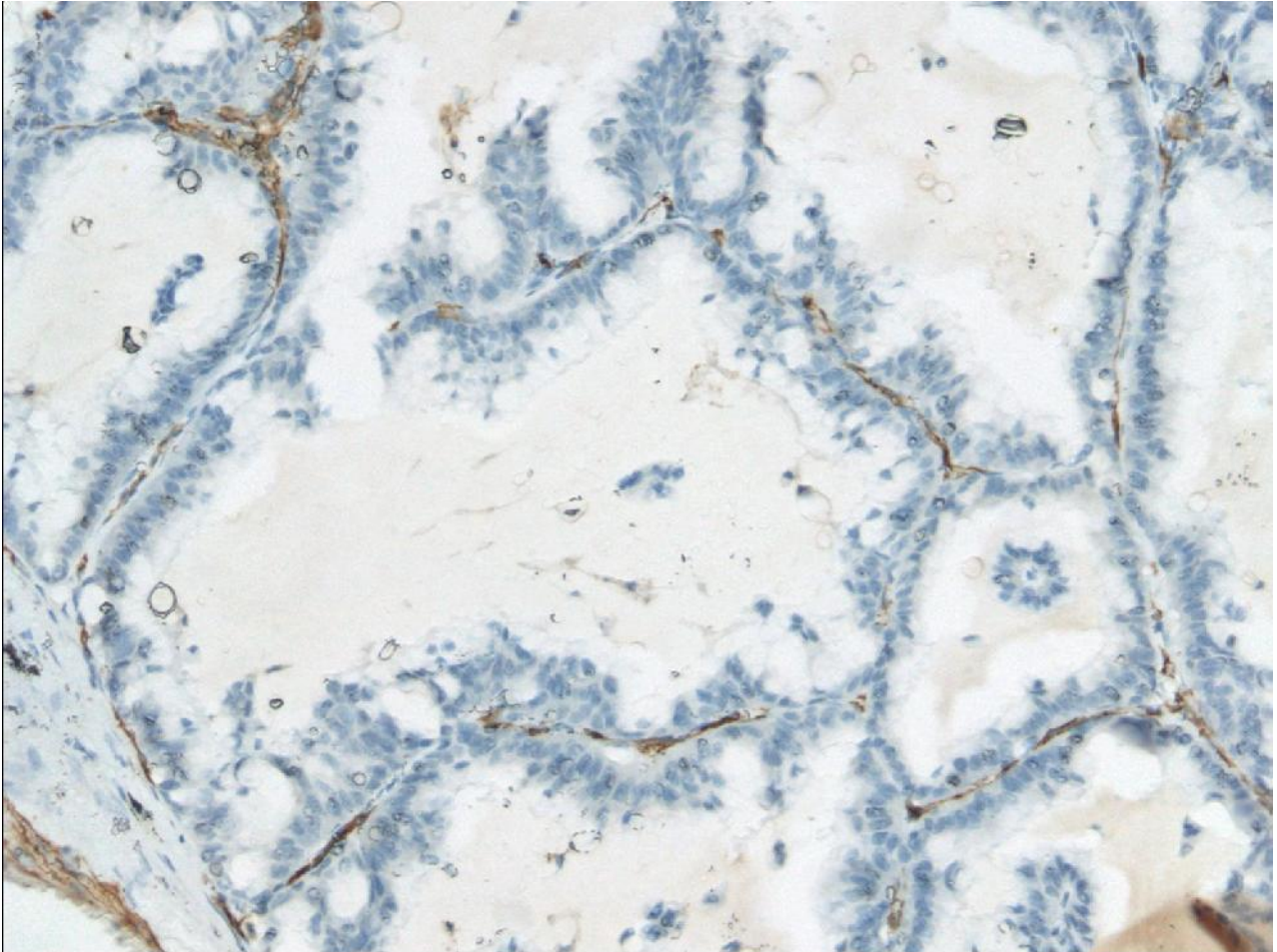


Figura 1. Immunoistochimica CD31: low MVD

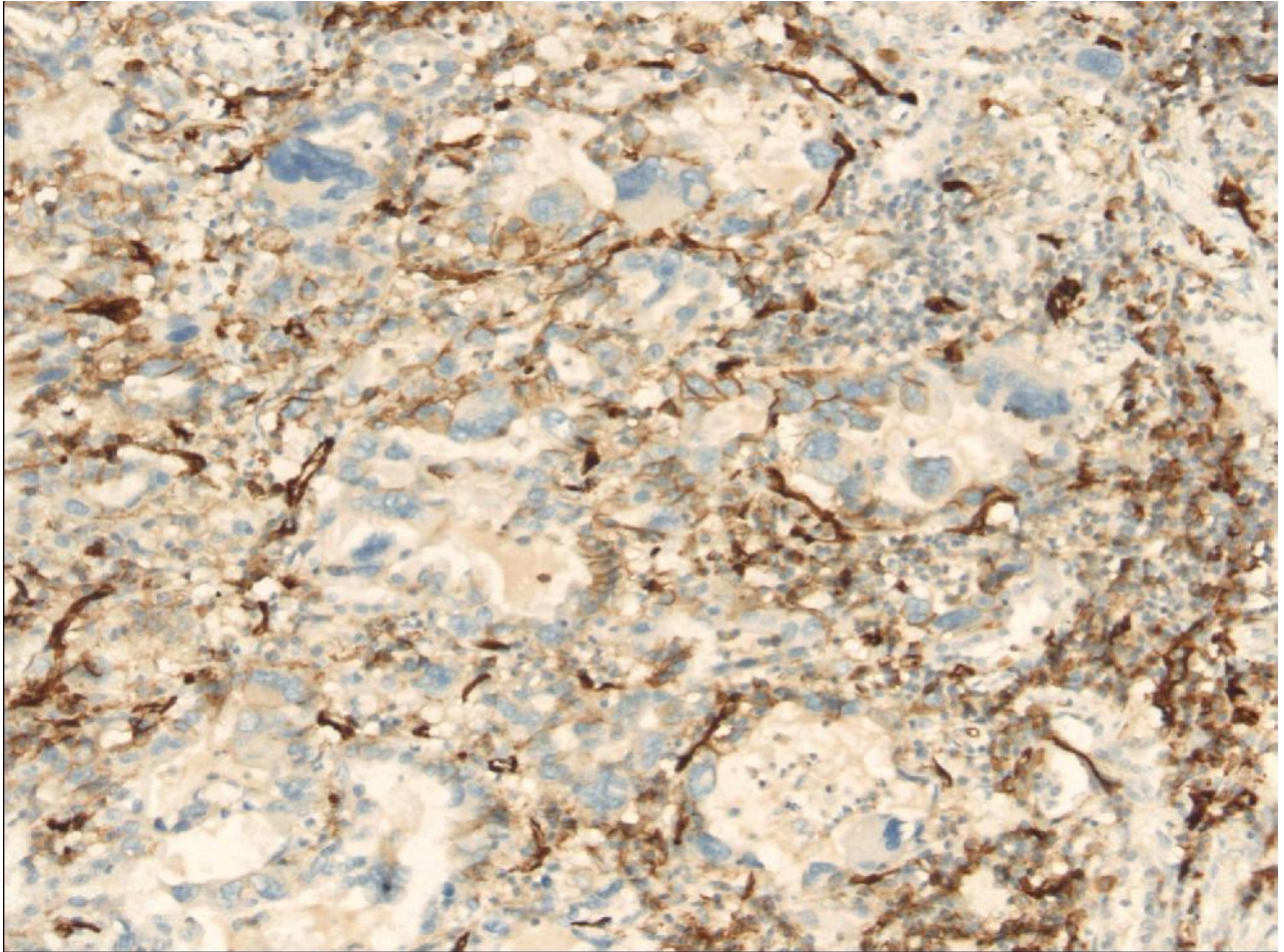


Figura 2. Immunoistochimica CD31: High MVD

7. Follow-up.

I pazienti sono stati seguiti per almeno 5 anni o fino al decesso.

Gli esami diagnostici di routine eseguiti durante il follow-up prevedevano una radiografia del torace e gli esami ematochimici a 30 giorni dall'intervento chirurgico, una radiografia del torace, un'ecografia addominale e gli esami ematochimici a 90 giorni, una Tc Torace senza mezzo di contrasto iodato, un'ecografia addominale, gli esami ematochimici con il dosaggio dei markers tumorali (CEA, CA19-9, CA125, NSE e FP) a 6 mesi dall'intervento, una TC Total Body con mezzo di contrasto iodato, gli esami ematochimici con il dosaggio dei markers tumorali a 12 mesi. Dopo il primo anno sono stati sottoposti a Tc Total Body con mezzo di contrasto annuale, intervallata da un esame radiografico del torace in 2 proiezioni ogni 6 mesi.

8. Metodologia dell'analisi statistica.

Il calcolo delle probabilità di sopravvivenza è stato realizzato con il metodo di Kaplan-Meier in relazione alle variabili cliniche (età, sesso, istotipo, diametro del tumore, tipo di resezione chirurgica e MVD); il valore prognostico delle variabili menzionate è stato testato mediante il long-rank test in un'analisi univariata (p significativa $< 0,05$).

Per determinare le variabili prognostiche indipendenti è stata condotta un'analisi multivariata includendo le variabili con p di 0,05 o inferiore, con il modello della regressione di Cox. La morte dei pazienti e la comparsa di una recidiva locale e/o sistemica (Disease Free Interval), sono stati definiti come eventi terminali ed analizzati separatamente.

Per valutare infine il valore statisticamente significativo dell'espressione della MVD nei differenti istotipi è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney.

L'analisi statistica è stata realizzata con i softwares GraphPad Prism® 6 for Windows Version 6.03 e MedCalc® Version 12.7.00

9. Risultati.

Caratteristiche clinico-patologiche.

Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sono state riassunte nella Tabella 3.

Lo studio ha compreso 82 pazienti, 60 maschi e 22 femmine, con un'età media di 68 anni (range 36-82, rapporto M/F=2,7/1); 49 pazienti con età \leq 70 anni (60%) e 33 pazienti con età $>$ 70 anni (40%).

Sono state eseguite 59 lobectomie (72%) e 23 resezioni sublobari – wedge resections e/o segmentectomie (28%), tutte accompagnate da linfadenectomia ilo-mediastinica.

Il diametro medio dei tumori polmonari asportati è stato di 18 mm (range 7 -20mm); 55 pazienti (67%) avevano una neoplasia di diametro $>$ 15mm, 27 pazienti (33%) con diametro \leq 15mm.

Per quanto riguarda l'istotipo 34 pazienti hanno presentato una diagnosi di Adenocarcinoma polmonare, 24 di Carcinoma Squamocellulare, 13 di Carcinoidi polmonari (10 tipici, 3 atipici) 6 di Carcinoma Bronchiolo-alveolare, 3 ad istotipo misto adeno-squamoso e 2 di Carcinoma Scarsamente differenziato a grandi cellule.

Ai fini dello studio i pazienti sono stati divisi in due gruppi in base all'istotipo: Adenocarcinoma (e Adenocarcinoma-like, comprendente quindi anche i 6 Carcinomi Bronchiolo-alveolari ed i 3 ad istotipo misto adenosquamoso) 43 pazienti (52%) e Non-adenocarcinoma 39 pazienti (48%).

Il grading istopatologico, rilevato in 56 pazienti, è stato rilevato come G3 in 15, G2 in 29, G1 in 12 pazienti.

La Microvessel density (MVD) è stata misurata in tutto il campione con i seguenti risultati: MVD media=161,2; mediana=148, range 50-365; i pazienti sono stati divisi in base al cut-off di 150 in due gruppi: pazienti ad alta espressione di MVD se > 150 CD31/mm² (40 pazienti 49%) e a bassa espressione se MVD ≤ 150 CD31/mm² (42 pazienti 51%).

TABELLA 3. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti in studio.

Fattori	No. (%)
<u>Età</u>	
70 anni	49 (60)
> 70 anni	33 (40)
<u>Sesso</u>	
Maschi	60 (73)
Femmine	22 (27)
<u>Diametro</u>	
> 15mm	55 (67)
15mm	27 (33)
<u>Intervento Chirurgico</u>	
Lobectomia	59 (72)
Resezione sublobare	23 (28)
<u>Istotipo</u>	
Adenocarcinoma	43 (52)
Non-adenocarcinoma	39 (48)
<u>Micro-Vessel-Density</u>	
> 150 CD31/mm ²	40 (49)
150 CD31/mm ²	42 (51)

Analisi prognostica. Univariata /multivariata.

I risultati dell'analisi prognostica univariata sono stati riassunti nella Tabella 4.

I fattori predittivi clinici statisticamente significativi mostrati dall'analisi univariata sono stati l'età (≤ 70 anni vs > 70 anni, $p = .0047$) e la Microvessel density (> 150 CD31/mm² vs ≤ 150 CD31/mm², $p = .0041$). Le curve di sopravvivenza statisticamente significative sono mostrate nelle Figure 3 e 4.

La sopravvivenza a 5 anni del totale dei pazienti in studio è risultata essere dell'83%.

La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti con MVD ≤ 150 e > 150 sono risultate, rispettivamente, 95% e 70%. Il sesso, il diametro, l'intervento chirurgico e l'istotipo non sono risultate variabili statisticamente significative nell'analisi prognostica.

I due fattori clinico-patologici statisticamente significativi, età e MVD, sono stati inclusi come covariate nell'analisi multivariata secondo il modello di regressione di Cox.

Di questi fattori, la Microvessel density è risultata un fattore prognostico con un livello di significatività indipendente ($p = 0,04$, HR=1,54, CI 95% 1,0416 – 5,9946).

Analisi prognostica dei sottogruppi.

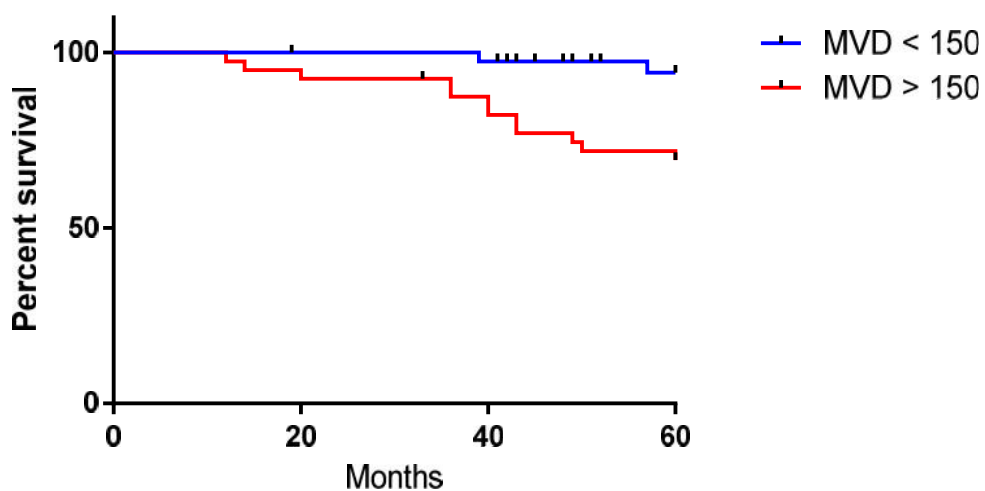
Per quanto riguarda l'analisi prognostica dei sottogruppi Adenocarcinoma e Non-Adenocarcinoma, la MVD è risultata statisticamente significativa nel gruppo Adenocarcinoma ($> 150 \text{ CD31/mm}^2$ vs 150 CD31/mm^2 , $p= 0,043$) nella sopravvivenza a 5 anni, rispettivamente 66% e 93% (Figura 4). Nel gruppo Non-adenocarcinoma la MVD non è risultata statisticamente significativa ($p= 0,097$).

Per confrontare l'espressione della MVD nei due sottogruppi si è proceduto al confronto delle mediane con il test di Mann-Whitney (mediana gruppo Adenocarcinoma=180 vs mediana gruppo Non-adenocarcinoma=125), risultato statisticamente significativo con una $p < 0,0001$.

TABELLA 4. Analisi prognostica univariata.

Variabile	Sopravvivenza a 5 anni	P-value
<u>Età</u>		
> 70 anni	96%	.0047
70 anni	73%	
<u>Sesso</u>		
Maschi	83%	.6016
Femmine	81%	
<u>Diametro</u>		
> 15mm	87%	.1560
15mm	74%	
<u>Intervento Chirurgico</u>		
Lobectomia	82%	.9078
Resezione sublobare	84%	
<u>Istotipo</u>		
Non-adenocarcinoma	87%	.1812
Adenocarcinoma	77%	
<u>Micro-Vessel-Density</u>		
150 CD31/mm ²	95%	.0041
> 150 CD31/mm ²	70%	

FIGURA 3. Curva di Kaplan-Meier per pazienti T1aN0M0 stratificata secondo la MVD.

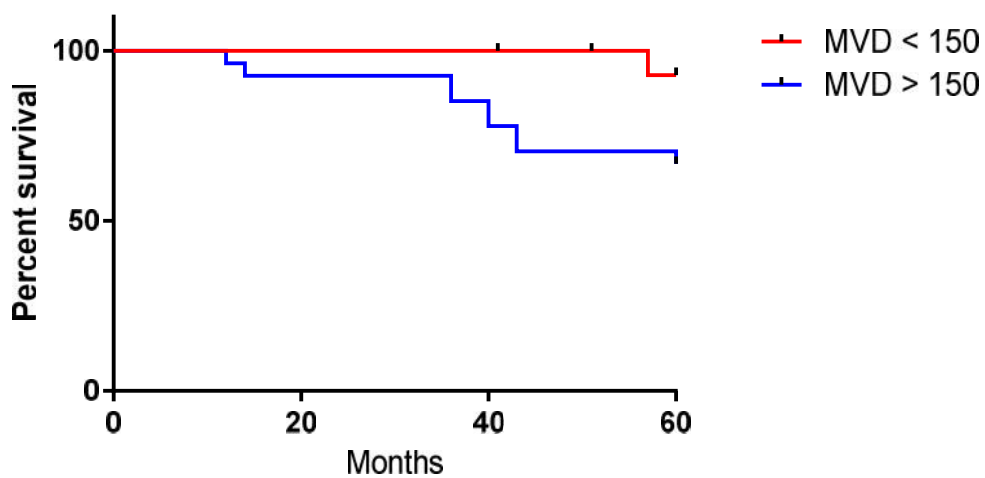


Sopravvivenza a 5 anni del gruppo di pazienti con MVD ≤ 150 Cd31/mm² = 95%

Sopravvivenza a 5 anni del gruppo di pazienti con MVD > 150 Cd31/mm² = 70%

P=0,0041 statisticamente significativa

FIGURA 4. Curva di Kaplan-Meier per pazienti T1aN0M0 istotipo Adenocarcinoma, stratificata secondo la Microvessel-Density.



Gruppo “Adenocarcinoma polmonare”:

Sopravvivenza a 5 anni del gruppo di pazienti con MVD ≤ 150 Cd31/mm² = 93%

Sopravvivenza a 5 anni del gruppo di pazienti con MVD > 150 Cd31/mm² = 66%

P=0,043 statisticamente significativa

10. Discussione e conclusioni.

L'analisi degli studi recenti più significativi presenti in letteratura sul ruolo prognostico dell'angiogenesi nel carcinoma polmonare non a piccole cellule riporta risultati contrastanti. ^[57,61,63,73-90].

Il focus del dibattito si concentra fundamentalmente su due punti: la scelta dell'anticorpo più idoneo per valutare l'angiogenesi e quale parametro andare ad indagare.

La maggior parte degli studi si è focalizzata sul ruolo prognostico di Blood Vessel Invasion (BVI) ^[61, 75-81, 85-90] e Lymphovascular Invasion (LVI) ^[73,75-76,78-79,81-83,86,90]; pochi Autori ^[57,61,63,77,84] hanno stimato il ruolo prognostico della Microvessel density (MVD) isolata o in associazione a BVI e LVI nel carcinoma polmonare non a piccole cellule.

Va sottolineato come in tutti gli studi in cui la MVD è stata presa in esame come fattore prognostico sulla sopravvivenza a lungo termine, essa sia risultata statisticamente significativa ^[57,61,63,77,84].

Per quanto riguarda la scelta dell'anticorpo, il numero di Autori che hanno preso in considerazione il CD31 per l'indagine immunohistochimica dell'angiogenesi nel tumore polmonare (da solo o in associazione ad altri marcatori dell'angiogenesi), è ridotto ^[57,61,63], nonostante siano presenti forti evidenze in letteratura che ne abbiano confermato l'uniformità di interpretazione e standardizzazione nei tumori solidi.

Va da sé che, causa della recente revisione della stadiazione TNM proposta da Goldstraw nel 2007 ed entrata in vigore dal 2009 ^[72], nessuno degli studi esaminati ha considerato come categoria di pazienti esclusiva, quelli sottoposti ad intervento chirurgico con stadiazione patologica pT1aN0M0.

Peraltro compaiono in alcuni studi sull'angiogenesi i carcinomi polmonari pT1aN0M0, ma in associazione a stadi più avanzati di malattia per raggiungere una numerosità significativa ^[57,61,63,73-90].

Possiamo affermare, quindi, che al momento lo studio oggetto di questo Dottorato di Ricerca non è presente in letteratura così come è stato ideato e realizzato; presenta tuttavia alcune similarità con altri studi, soprattutto nell'analisi prognostica dei sottogruppi, argomento che tratteremo in seguito.

La sopravvivenza del totale dei pazienti arruolati allo studio è pari all'83%, in linea con la letteratura presa in esame riguardante gli Autori che hanno valutato i pazienti affetti da cancro polmonare nei primi stadi ^[73,75,78,82,83,86-88,90].

La sopravvivenza del gruppo ad alta espressione di MVD (> 150 CD31/mm²) nel nostro studio, è del 70% a 5 anni; per neoplasie in stadio iniziale, generalmente considerate "chirurgicamente guarite" all'atto della dimissione, è un dato molto rilevante.

Se confrontato con la sopravvivenza del gruppo a bassa espressione di MVD (< 150 CD31/mm²) che raggiunge ben il 95% degli osservati, si comprende come la MVD possa inserirsi a pieno diritto tra i fattori prognostici del carcinoma polmonare (p=0,0041); in questo senso l'obiettivo dello studio è stato pienamente raggiunto.

Il valore soglia di Microvessel density pari a 150 CD31/mm² può essere considerato quindi un cut-off prognostico statisticamente significativo nei tumori polmonari non a piccole cellule pT1aN0M0.

L'analisi dei sottogruppi secondo l'istotipo mostra inoltre come la MVD abbia un ruolo prognostico rilevante soprattutto negli Adenocarcinomi polmonari, come confermato da altri studi in letteratura ^[74,78], sebbene l'accento di questi sia stato spostato soprattutto sull'invasione angiolinfatica ^[75,78].

In questo contesto la permeazione di vasi e linfatici peritumorali sembra essere correlata ad una più frequente insorgenza di metastasi a distanza, come anche confermato dai nostri dati.

Dai risultati del nostro studio emerge chiaramente come la MVD sia risultata statisticamente significativa nel gruppo "Adenocarcinoma" (> 150 CD31/mm² vs 150 CD31/mm², p= 0,043) nella sopravvivenza a 5 anni, rispettivamente 66% e 93%. Al contrario nel gruppo "Non-adenocarcinoma" la MVD non è risultata statisticamente significativa (p= 0,097).

Non è trascurabile inoltre il dato relativo al confronto delle mediane della MVD nei due sottogruppi "Adenocarcinoma" e "Non-adenocarcinoma" mediante il test di Mann-Whitney (mediana gruppo Adenocarcinoma=180 CD31/mm² vs mediana gruppo Non-adenocarcinoma=125 CD32/mm²), risultato statisticamente significativo con una p < 0,0001.

I valori di MVD risultano quindi più elevati nel gruppo "Adenocarcinoma" del nostro studio, in accordo con il comportamento biologico più aggressivo di questo istotipo

tumorale, che può dare rapidamente metastasi a distanza e recidiva locale, sebbene trattato chirurgicamente nei primi stadi N0.

Il dato statisticamente significativo sull'età inferiore ai 70 anni come fattore prognostico negativo nella sopravvivenza a 5 anni, come emerso dal nostro studio, non è di univoca interpretazione. Da un lato saremmo più propensi ad interpretare questo dato alla luce di un comportamento biologico più aggressivo delle neoplasie polmonari nei pazienti di giovane età; non si può tuttavia trascurare il valore delle comorbilità che aumentano proporzionalmente all'età più avanzata.

Riconduco questo dato apparentemente contrastante con il numero ridotto dei pazienti in studio, che non permette di trarre conclusioni definitive in merito al dato dell'età come fattore prognostico.

A compimento dell'analisi statistica abbiamo inserito i due fattori clinico-patologici statisticamente significativi (età e MVD) come covariate nell'analisi multivariata secondo il modello di regressione di Cox e la Microvessel density è risultata comunque un fattore prognostico con un livello di significatività indipendente ($p=0,04$, $HR=1,54$, $CI\ 95\% 1,0416 - 5,9946$).

Lo step successivo a queste considerazioni riguarda o meno la possibilità di trattare i pazienti sottoposti a resezione polmonare “curativa” per neoplasie pT1aN0M0 a terapie adiuvanti “target”, come suggerito da Funai et al ^[82].

Uno studio significativo prodotto dal Japan Lung Cancer Research Group (JLCRG) sulla chemioterapia adiuvante ha mostrato che il tegafur-uracile (UFT) , farmaco

antiangiogenico, riduce il rischio di morte nei pazienti con tumore polmonare adenocarcinoma ai primi stadi ^[91].

Tuttavia in questo studio, l'analisi di un sottogruppo di pazienti con malattia T1 ha mostrato un trend positivo nell'aumento della sopravvivenza dei pazienti con tumori dai 2 ai 3 cm di diametro (T1b), ma non nei pazienti con diametro inferiore ai 2 cm, appunto i T1a.

In questo senso il ruolo della terapia antiangiogenica nei tumori polmonari nei primi stadi non può che essere oggetto di grandi controversie.

Non ultimi e trascurabili sono gli aspetti "culturali": come spiegare infatti a un paziente che viene generalmente congedato al momento della dimissione con la garanzia di avere ricevuto un trattamento curativo e definitivo che dovrà sottoporsi a chemioterapia?

Le evidenze sin qui riscontrate riguardano perlopiù studi retrospettivi singoli e un trial clinico prospettico multicentrico aprirebbe un inevitabile dibattito etico.

Indispensabile l'esperienza dell'anatomo-patologo nella lettura dell'immunoistochimica e, se possibile, il coinvolgimento più anatomo-patologi che condividano la stessa metodica di conteggio dei vasi neoformati.

Allo stato attuale, l'estensione anatomica della malattia neoplastica polmonare, così com'è descritta nell'ultima revisione del TNM ^[72], rimane l'indicatore prognostico più importante nel tumore polmonare non a piccole cellule. Tuttavia, sarebbe interessante nel futuro integrare il TNM attuale con fattori patologici specifici, come la Microvessel density, l'invasione angiolinfatica, il grading di differenziazione, in

modo da creare uno score prognostico multifattoriale per il tumore polmonare non a piccole cellule.

Più elementi e fattori prognostici si avranno a disposizione, maggiori saranno le possibilità di cura.

L'obiettivo del TNM è sempre stato quello di sottostadiare le popolazioni dei diversi pazienti affetti da tumore polmonare per arrivare ad una stratificazione prognostica il più accurata possibile. Tuttavia anche all'interno di un gruppo selezionato come quello dei pazienti pT1aN0M0 sono presenti sottogruppi con diverse prognosi e diverso rischio di ricorrenza neoplastica, così come è emerso dai risultati dell'analisi statistica.

Lo studio che abbiamo condotto dimostra che la Microvessel density può essere considerata un fattore prognostico indipendente nei tumori polmonari non a piccole cellule pT1aN0M0; il CD31 si è rivelato un marker endoteliale affidabile fornendo risultati in linea con la letteratura corrente sia dal punto di vista quantitativo che prognostico.

Le prospettive di questo studio sono quelle di focalizzare l'attenzione sui soli Adenocarcinomi polmonari, escludendo le neoplasie squamocellulari e neuroendocrine; realizzare uno studio multicentrico su larga scala, mirato a raggiungere un numero di pazienti non inferiore alle 200 unità; inserire nell'indagine immunohistochimica gli anticorpi CD34 e CD105 per valutarne la rilevanza prognostica come marcatori di MVD; stabilire infine se, per pazienti sottoposti a chirurgia radicale di adenocarcinomi polmonari in stadio iniziale pT1aN0M0, con

una elevata Microvessel density, siano indicate terapie adiuvanti con migliori risultati nella sopravvivenza a lungo termine e nella riduzione delle recidive locali e a distanza.

11. Bibliografia.

- [1] Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
- [2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
- [3] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
- [4] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
- [5] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
- [6] Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:24-33.
- [7] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
- [8] Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991;53:217-39.
- [9] Klintworth GK. The hamster cheek pouch: an experimental model of corneal vascularization. *Am J Pathol* 1973;73:691-710.
- [10] Folkman J. Proceedings: Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974;34:2109-13.

- [11] Gimbrone MA, Jr., Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:413-27.
- [12] Andrade SP, Fan TP, Lewis GP. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp Pathol* 1987;68:755-66.
- [13] Passaniti A, Taylor RM, Pili R, et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992;67:519-28.
- [14] Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach R. The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* 2002;5:75-80.
- [15] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-87.
- [16] Kumar S, Ghellal A, Li C, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999;59:856-61.
- [17] Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401-9.
- [18] Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF, Doig GS, Kerkvliet N, O'Malley FP. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes staging. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1260-5.

- [19] Kamijo T, Yokose T, Hasebe T, et al. Potential role of microvessel density in predicting radiosensitivity of T1 and T2 stage laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2000;6:3159-65.
- [20] Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:881-6.
- [21] Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, et al. Prognostic value of angiogenesis in operable non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1996;179:80-8.
- [22] Meert AP, Paesmans M, Martin B, et al. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2002;87:694-701.
- [23] Apolinario RM, van der Valk P, de Jong JS, et al. Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997;15:2456-66.
- [24] Offersen BV, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Patterns of angiogenesis in nonsmall-cell lung carcinoma. *Cancer* 2001;91:1500-9.
- [25] Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997;15:2858-65.
- [26] Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* 2001;7:3410-5.

- [27] Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* 2003;17:984-92.
- [28] Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al-Nakib L. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:386-8.
- [29] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:1794-8.
- [30] Wester K, Ranefall P, Bengtsson E, Busch C, Malmstrom PU. Automatic quantification of microvessel density in urinary bladder carcinoma. *Br J Cancer* 1999;81:1363-70.
- [31] Kamijo T, Yokose T, Hasebe T, et al. Image analysis of microvessel surface area predicts radiosensitivity in early-stage laryngeal carcinoma treated with radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:2809-14.
- [32] Weber WA, Haubner R, Vabuliene E, Kuhnast B, Wester HJ, Schwaiger M. Tumor angiogenesis targeting using imaging agents. *Q J Nucl Med* 2001;45:179-82.
- [33] Graeven U, Andre N, Achilles E, Zornig C, Schmiegel W. Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:577-81.
- [34] Stockhammer G, Obwegeser A, Kostron H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is elevated in brain tumor cysts and correlates with tumor progression. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;100:101-5.

- [35] Wallner G, Ciechanski A, Dabrowski A, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with squamous cell oesophageal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39 Suppl 2:122-3.
- [36] Dehaven K, Taylor DD, Gercel-Taylor C. Comparison of serum vascular endothelial growth levels between patients with and without ovarian malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:715-9.
- [37] Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998;79:144-6.
- [38] Takigawa N, Segawa Y, Fujimoto N, Hotta K, Eguchi K. Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res* 1998;18:1251-4.
- [39] Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest* 2000;118:948-51.
- [40] Choi JH, Kim HC, Lim HY, et al. Vascular endothelial growth factor in the serum of patients with non-small cell lung cancer: correlation with platelet and leukocyte counts. *Lung Cancer* 2001;33:171-9.
- [41] Kido Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) serum concentration changes during chemotherapy in patients with lung cancer. *Kurume Med J* 2001;48:43-7.

- [42] Tamura M, Ohta Y, Kajita T, et al. Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2001;8:1097-102.
- [43] Mall JW, Schwenk W, Philipp AW, et al. Serum vascular endothelial growth factor levels correlate better with tumour stage in small cell lung cancer than albumin, neuron-specific enolase or lactate dehydrogenase. *Respirology* 2002;7:99-102.
- [44] Hunter J. Lectures on the principles of surgery. In: Palmer J, ed. *The works of John Hunter*. London, 1787 (vol I).
- [45] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
- [46] Brem H, Folkman J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J Exp Med* 1975;141:427-39.
- [47] Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 1984;223:1296-9.
- [48] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
- [49] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.

- [50] Kruger EA, Figg WD. TNP-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9:1383-96.
- [51] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-85.
- [52] Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:60-5.
- [53] Muller WA. AS9. CD31 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. *Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10–14; Kobe, Japan.* New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 362–4.
- [54] Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990;43:752–7.
- [55] DeYoung BR, Swanson PE, Argenyi ZB, Ritter JH, Fitzgibbon JF, Stahl DJ, et al. CD31 immunoreactivity in mesenchymal neoplasms of the skin and subcutis: Report of 145 cases and review of putative immunohistologic markers of endothelial differentiation. *J Cutan Pathol* 1995;22:215–22.
- [56] Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC, et al. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1044–9.

- [57] Kreuter M, Kropff M, Fischaleck A, et al. Prognostic relevance of angiogenesis in stage III NSCLC receiving multimodality treatment. *Eur Respir J.* 2009;33:1383-1388.
- [58] Choi WW, Lewis MM, Lawson D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF family gene expression. *Mod Pathol.* 2005;18:143-152.
- [59] Pathak AP, Hochfeld WE, Goodman SL, Pepper MS. Circulating and imaging markers for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008;11:321-335.
- [60] Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, et al. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:7344-7353.
- [61] Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2004;57:591- 597.
- [62] Kadota K, Huang CL, Liu D, et al. The clinical significance of lymphangiogenesis and angiogenesis in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer.* 2008;44:1057-1067.
- [63] Han H, Silverman JF, Santucci TS, et al. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol.* 2001;8:72-79.

- [64] O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, et al. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2000;82:1427-1432.
- [65] Trivella M, Pezzella F, Pastorino U, Harris AL, Altman DG. Microvessel density as a prognostic factor in non small-cell lung carcinoma: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2007;8:488-499.
- [66] Jain RK, Duda DG, Willett CG, et al. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:327-338.
- [67] Ng QS, Goh V. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: imaging with perfusion computed tomography. *J Thorac Imaging*. 2010;25:142-150.
- [68] de Langen AJ, Lubberink M, Boellaard R, et al. Reproducibility of tumor perfusion measurements using 15O-labeled water and PET. *J Nucl Med*. 2008;49:1763-1768.
- [69] Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 883–893.
- [70] Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2474–2484.
- [71] Hattori H. Caution should be taken in using CD31 for distinguishing the vasculature of lymph nodes. *J Clin Pathol* 2003; 56: 638–639.

- [72] Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol.* 2007 Aug;2(8):706-14.
- [73] Hashizume S, Nagayasu T, Hayashi T, Hidaka S, Tsuchiya T, Tagawa T, Yamasaki N, Furukawa K, Matsumoto K, Miyazaki T. Accuracy and prognostic impact of a vessel invasion grading system for stage IA non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009 Sep;65(3):363-70.
- [74] Ullah E, Nagi AH, Lail RA. Angiogenesis and mast cell density in invasive pulmonary adenocarcinoma. *J Cancer Res Ther.* 2012 Oct-Dec;8(4):537-41
- [75] Kato T, Ishikawa K, Aragaki M, Sato M, Okamoto K, Ishibashi T, Kaji M. Angiolymphatic invasion exerts a strong impact on surgical outcomes for stage I lung adenocarcinoma, but not non adenocarcinoma . *Lung Cancer.* 2012 Aug;77(2):394-400.
- [76] Igai H, Matsuura N, Tarumi S, Chang SS, Misaki N, Go T, Ishikawa S, Yokomise H. Clinicopathological study of p-T1aN0M0 non-small-cell lung cancer, as defined in the seventh edition of the TNM classification of malignant tumors. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011 Jun;39(6):963-7.

- [77] Ushijima C, Tsukamoto S, Yamazaki K, Yoshino I, Sugio K, Sugimachi K. High vascularity in the peripheral region of non-small cell lung cancer tissue is associated with tumor progression. *Lung Cancer*. 2001 Nov;34(2):233-41.
- [78] Mizuno T, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Mochizuki T, Kawai O, Hasebe T, Ochiai A. Identification of a low risk subgroup of stage IB lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*. 2008 Dec;62(3):302-8.
- [79] Harada M, Hato T, Horio H. Intratumoral lymphatic vessel involvement is an invasive indicator of completely resected pathologic stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011 Jan;6(1):48-54.
- [80] Gabor S, Renner H, Popper H, Anegg U, Sankin O, Matzi V, Lindenmann J, Smolle Jüttner FM. Invasion of blood vessels as significant prognostic factor in radically resected T1-3N0M0 non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Mar;25(3):439-42.
- [81] Kelsey CR, Higgins KA, Peterson BL, Chino JP, Marks LB, D'Amico TA, Varlotto JM. Local recurrence after surgery for non-small cell lung cancer: a recursive partitioning analysis of multi-institutional data. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 Oct;146(4):768-773.
- [82] Funai K, Sugimura H, Morita T, Shundo Y, Shimizu K, Shiiya N. Lymphatic vessel invasion is a significant prognostic indicator in stage IA lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Oct;18(10):2968-72.

- [83] Higgins KA, Chino JP, Ready N, D'Amico TA, Berry MF, Sporn T, Boyd J, Kelsey CR. Lymphovascular invasion in non-small-cell lung cancer: implications for staging and adjuvant therapy. *J Thorac Oncol*. 2012 Jul;7(7):1141-7.
- [84] Takanami I, Takeuchi K, Naruke M. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*. 2000 Jun 15;88(12):2686-92.
- [85] Shoji F, Haro A, Yoshida T, Ito K, Morodomi Y, Yano T, Maehara Y. Prognostic significance of intratumoral blood vessel invasion in pathologic stage IA non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2010 Mar;89(3):864-9.
- [86] Shimada Y, Saji H, Yoshida K, Kakihana M, Honda H, Nomura M, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Pathological vascular invasion and tumor differentiation predict cancer recurrence in stage IA non-small-cell lung cancer after complete surgical resection. *J Thorac Oncol*. 2012 Aug;7(8):1263-70.
- [87] Miyoshi K, Moriyama S, Kunitomo T, Nawa S. Prognostic impact of intratumoral vessel invasion in completely resected pathologic stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Feb;137(2):429-34.
- [88] Maeda R, Yoshida J, Ishii G, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Risk factors for tumor recurrence in patients with early-stage (stage I and II) non-small cell lung cancer: patient selection criteria for adjuvant chemotherapy according to the seventh edition TNM classification. *Chest*. 2011 Dec;140(6):1494-502.

- [89] Ito T, Murakawa T, Satob H, Tanabea A, Maekawa M, Yoshida Y, Fukayama M, Nakajima J. Simple preoperative computed tomography image analysis shows good predictive performance for pathological vessel invasion in clinical stage IA non-small cell lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012 Oct;15(4):633-8.
- [90] Tsuchiya T, Akamine S, Muraoka M, Kamohara R, Tsuji K, Urabe S, Honda S, Yamasaki N. Stage IA non-small cell lung cancer: vessel invasion is a poor prognostic factor and a new target of adjuvant chemotherapy. *Lung Cancer*. 2007 Jun;56(3):341-8.
- [91] Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H; Japan Lung Cancer Research Group on Postsurgical Adjuvant Chemotherapy. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 2004 Apr 22;350(17):1713-21.