



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Departamento de Medicina

**Estudio de células endoteliales, células progenitoras endoteliales, micropartículas  
circulantes y marcadores de inflamación, coagulación y angiogénesis en pacientes  
con Carcinoma Pulmonar No Microcítico**

**Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía**

**Autora:**

**Tania Carolina Fleitas Kanonnikoff**

**Directores de tesis:**

**-Dra. Vicenta Martínez Sales.**

**-Dr. José Gomez Codina.**

**-Dr. Rafael Rosell**

**2011**

A Jose Alberto y a mis padres.

## **Agradecimientos:**

Este trabajo es el cierre de un ciclo de aprendizaje y el inicio de otro, donde he aprendido disciplina, técnica, método científico y a trabajar en equipo. Este es el resultado de tres años de intenso trabajo de un equipo de investigación.

Mi agradecimiento especial a todas las personas que hicieron posible el desarrollo de este proyecto:

En primer lugar, mi agradecimiento especial a Gaspar Reynés, tutor honorífico de esta tesis, quien ha participado en cada paso de la misma, con alegría y entusiasmo, objetivo tras objetivo.

En segundo lugar a todo el equipo investigador del centro de investigación del Hospital La Fe de Valencia, en especial a la Dra. Vicenta Martínez-Sales, por haber aceptado ser mi tutora y por todo el apoyo, al Dr. Edelmiro Reganon, a la Dra. Virtudes Vila, a Josefa Llorens y a David Mesado, quienes han participado en la realización de este proyecto y he aprendido con ellos metodología científica, el valor del trabajo en equipo y sobre todo la amistad, el apoyo y calidez que me brindaron desde el primer día. También agradezco al Dr. Francisco España su apoyo para la realización del proyecto en el centro de investigación.

Al Dr. Gomez Codina, por el estímulo diario, por haber creído en el proyecto, por haber aceptado ser mi tutor, por haber convencido a nuestros auspiciantes del interés de la realización de este estudio, por la paciencia y las correcciones paso a paso.

Al Dr. Rafael Rosell, por haber aceptado ser tutor de esta tesis y por el apoyo en la realización de la misma.

A la Dra. María Martín, y a los residentes por su colaboración en el reclutamiento de pacientes.

Al Dr. Joaquín Montalar por su apoyo para la realización del proyecto.

A los miembros del tribunal, por haber aceptado formar parte del mismo.

A *Roche Farma S.A.* por el apoyo económico, bibliográfico y estadístico que ha sido fundamental para la realización de este trabajo.

A *Amgen S.A., Lilly S.A., MSD&Co, y BayerS.A.* por el apoyo económico.

Al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y a la Fundación Bancaja: que gracias a la III convocatoria de contratos para post-residentes me han permitido durante 3 años trabajar y aprender en este proyecto.

A José Alberto, a mis padres y a mis amigos, su apoyo incondicional es la base de cada objetivo logrado en mi vida.

Para finalizar, especial agradecimiento a los pacientes que han aceptado participar en el proyecto. Este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

## Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
	Ensayo clínico Randomizado fase III basado en quimioterapia con sales de platino que demostró beneficio clínico de la adyuvancia en pacientes con CPNM
ANITA	
ANOVA	Análisis de la varianza
ASCO	Sociedad Americana de Oncología Clínica
AUC 6	Área bajo la curva 6
	Expresión del gen del cancer de mama, útil como marcador de resistencia a las sales de platino
BRCA1	
CAT	Método de trombograma calibrado automatizado
CD	Cluster of differentiation
CD133	Cluster of differentiation 133
CD146	Cluster of differentiation 146
CD31	Cluster of differentiation 31
CD45	Cluster of differentiation 45
CD62E	Cluster of differentiation 62 E
CECs	Células endoteliales circulantes
CK	Citoqueratinas.
CK5	Marcadores característicos relacionados con la queratinización
CK6	Marcadores característicos relacionados con la queratinización
CPNM	Carcinoma de Pulmón No Microcítico
DLCO	Medición de la difusión del anhídrido carbónico
	Fluorescence excitation and emission spectra of SYTO® 16 green fluorescent
DNA/Syto16	nucleic acid stain bound to DNA
	Técnica que permite la visualización por ultrasonido al broncoscopista de las lesiones a través del lumen de la vía aérea.
EBUS	(Endobronchial Ultrasound for the diagnosis and staging of lung cancer)
ECOG	Escala (Eastern Cooperative Group) que mide el estado general del paciente del 0 al 4
EGFR	Gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico
	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ELISA	
ELISAMRX Revelat	Lector de inmunoabsorción ligado a enzimas
	Gen de fusión aberrante que codifica una proteína citoplasmática quimérica
EML4-ALK	

	constitutiva con actividad quinasa
EPCs	Células progenitoras endoteliales
EPICS XL-LCM	Modelo de Citómetro
EPO-alfa	Eritropoyetina alfa
	Expresión de la proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada, útil como marcador de resistencia a las
ERCC1	sales de platinos
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Medica
FEV1	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
G	Guanina
G-CSF	Estimulantes de colonias
GET	Generación endógena de Trombina
GT	Generación de Trombina
HAA	Hiperplasia alveolar atípica
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
HR	hazard ratio" (HR) o razón de riesgo
H-RAS	Proto-oncogenes Ras que codifican pequeñas GTPasas
	Ensayo clínico Randomizado fase III basado en quimioterapia con
IALT	sales de platino que demostró beneficio clínico de la adyuvancia en CPNM
IC	Intervalo de confianza
IL6	Interleukina 6
ILE	Intervalo Libre de Enfermedad
	Ensayo clínico Randomizado fase III basado en quimioterapia con
	sales de platino
JBR10	que demostró beneficio clínico de la adyuvancia en CPNM
KDR	Receptores de expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF
K-RAS	Proto-oncogenes Ras que codifican pequeñas GTPasas
LACE	Metaanálisis
M	Metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia.
	Nódulo tumoral separado en un lóbulo contralateral; tumor con
M1a	nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) maligno.
M1b	Metástasis a distancia
MPs	Micropartículas
MTTKI	Inhibidores de la tirosina quinasa
MX	No se puede evaluar la metástasis a distancia
N	Ganglios linfáticos regionales
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

	Metástasis en los ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales o los ganglios linfáticos hiliares ipsilaterales y ganglios intrapulmonares comprometidos por extensión directa del tumor primario.
N1	Metástasis en el/los ganglio(s) linfático(s) mediastínico (s) ipsilateral (es)
N2	o en el/los ganglio (s) linfático (s) subcarinal (es)
	Metástasis en el/los ganglio(s) linfático(s) mediastínico (s) contralateral (es), hilar (es) contralateral (es), escaleno (es) ipsilateral (es) o
N3	contralateral (es), o supraclavicular (es).
	Ensayo multicéntrico fase III de pacientes asignados al azar a cirugía sola vs quimioterapia neoadyuvante seguida de cirugía o cirugía seguida de quimioterapia adyuvante
NATCH	
N-RAS	Proto-oncogenes Ras que codifican pequeñas GTPasas
	Grupo Colaborativo de Carcinoma de Pulmón no microcítico
NSCLCCG	(Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group)
NX	Ganglios linfáticos regionales que no se pueden evaluar
OMS	Organización Mundial de la Salud
PET	Tomografía por emisión de positrones
PFS	Supervivencia libre de progresión
PLP	Plasma libre de Plaquetas
PORT	Tratamiento adyuvante con radioterapia
	Estado de actividad o Performance Status, medida general en bruto
PS	del estado funcional del paciente
R	Coeficiente de múltiples correlaciones
R2	Coeficiente de determinación
	Proteínas reguladoras. Relacionadas con la vía EGFR que envían
RAS	señales de proliferación al núcleo
	Expresión de la subunidad 1 grande de la ribo nucleótido reductasa, útil como
RRM1	marcador de resistencia a gemcitabina
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SEER	Análisis de la Surveillance, Epidemiology and end Result
SG	Electrocardiograma
sVEGF-R1	Receptores soluble 1 del VEGF
sVEGF-R2	Receptores soluble 2 del VEGF
T	Timidina
T	Tumor Primario
T0	No hay prueba de tumor primario
	Tumor de 3 cm o de menos en su mayor dimensión, rodeado de pleura
T1	pulmonar o visceral, y sin prueba broncoscópica de invasión más

	proximal que un lóbulo bronquial.
T1a	Tumor menor de 2 cm
T1b	Tumor entre 2 y 3 cm
	Tumor mayor de 3 cm en su dimensión mayor, compromete el bronquiolo principal y a 2 cm o más de la carina, invade la pleura visceral, Atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hilar,
T2	pero que no compromete todo el pulmón
T2a	Tumor > 3 cm pero < o igual a 5 cm
T2b	Tumor > 5 cm pero < 7 cm
	Tumor < 7 cm o de cualquier tamaño que invade directamente cualquiera de los siguientes sitios: pared torácica (incluso tumores del surco superior), diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina pero sin compromiso de la carina; o atelectasia relacionada con neumonitis obstructiva de todo el pulmón así
T3	como la presencia de nódulos adicionales en el mismo lóbulo. Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes sitios: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral, carina; o la presencia de nódulo/s adicional/es en lóbulo homolateral diferente aquel del
T4	tumor primario
TAC	Tomografía axial computarizada
TF	Factor Tisular
Tis	Carcinoma in situ
TNM	Sistema de estadificación y clasificación de los Tumores Malignos
TS	Timidilato sintasa
TSP1	Trombospondina-1
	Anticuerpo Factor 1 de transcripción tiroideo, útil como marcador de tumores
TTF1	originarios de pulmón o de tiroides
TX	Tumores primario que no se puede evaluar
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGF-A	Factor de crecimiento vascular endotelial –A
VEGF-B	Factor de crecimiento vascular endotelial –B
VEGF-C	Factor de crecimiento vascular endotelial –C
VEGF-D	Factor de crecimiento vascular endotelial –D
VEGF-F	Factor de crecimiento vascular endotelial –F
VEGFR1-3	Receptores de expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF
VO	Vía Oral

## **INDICE**

### **1.INTRODUCCIÓN**

#### **1.1. Cáncer de pulmón**

Epidemiología y etiopatogenia	3
Clasificación anatómopatológica	5
Estadificación	9
Diagnóstico:	
-    Técnicas no invasivas	12
-    Técnicas invasivas	13
Evaluación funcional	14
Estudio de extensión	15
Tratamiento	
-    En estadios iniciales	15
-    En estadios avanzados	19

#### **1.2 Angiogénesis:**

Angiogénesis tumoral, fisiopatología	21
Inhibidores de la angiogénesis: bevacizumab	22
Células endoteliales circulantes y células endoteliales progenitoras en el cáncer.	23
Las Células endoteliales circulantes y las células progenitoras endoteliales pacientes con CPNM	24
Utilidad de la medición de las CECs y EPCs en pacientes con terapia antiangiogénica	25
Hipercoagulabilidad en pacientes con cáncer	26
Marcadores de angiogénesis, inflamación y coagulación en CPNM	27

### **2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

#### **2.1. Hipótesis** **33**

#### **2.2. Objetivo principal** **33**

#### **2.3. Objetivos secundarios** **33**

### **3. PACIENTES**

#### **3.1. Criterios de inclusión** **37**

#### **3.2 Criterios de exclusión** **38**

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.1.Diseño del estudio** **41**

<b>4.2. Variables clínicas</b>	<b>41</b>
<b>4.3. Variables de laboratorio</b>	<b>42</b>
4.3.1. Extracción y procesamiento de muestras de sangre	42
Técnicas para la determinación de proteínas relacionadas con la angiogénesis, coagulación e inflamación:	43
4.3.2.1. Técnicas inmunológicas. Elisa tipo sándwich	43
Determinación de los niveles del VEGF	44
Determinación de sVEGFR1, VEGFR2, FT, TSP1 e IL6	44
4.3.2.2. Técnicas de coagulación	47
Cuantificación de generación de trombina	47
4.3.2.3. Técnica inmunomagnética	47
Cuantificación de Células Endoteliales Circulantes	47
4.3.2.4. Técnicas de citometría de flujo	50
Cuantificación de MPs	50
Determinación de EPCs	50
4.4. Análisis estadístico	59
4.5 Aspectos éticos	61
4.6. Limitaciones del estudio	61
<b>5.RESULTADOS</b>	
<b>5.1. Descriptivo</b>	<b>65</b>
Características basales	66
Tratamiento y toxicidad	66
Fenómenos trombóticos	68
Respuesta clínica	68
Supervivencia	68
<b>5.2. Análisis de marcadores de angiogénesis, daño endotelial e inflamación</b>	<b>74</b>
<b>5.3. Valor pronóstico de los niveles basales de las variables</b>	<b>79</b>
Supervivencia según niveles basales de CECs ( percentil 75 en pacientes)	79
Supervivencia según niveles basales de las variables (respecto percentil 99 de los controles)	80
Intervalo libre de enfermedad según niveles basales de las variables ( percentil 99 de los controles)	83

Asociación entre la progresión de enfermedad y los valores basales de las variables	86
<b>5.4. Correlación de las variables</b>	<b>88</b>
<b>5.5. Valor pronóstico y predictivo de las variables tras el tratamiento</b>	<b>89</b>
<b>5.6. Influencia del bevacizumab sobre las variables</b>	<b>91</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>97</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>103</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>107</b>
<b>9. APÉNDICE</b>	<b>123</b>
Hojas de recogida de datos	123
- Hoja informativa y Consentimiento informado	134
Presentación en congresos y artículos publicados relacionados con el tema.	138

## ***Índice de tablas y figuras:***

### **Tabla**

1.1. Tipos histológicos del Carcinoma pulmonar no microcítico:	6
1.2. Grados histológicos	7
1.3. <b>Definiciones TNM :</b>	10
1.4. Clasificación de los estadios clínicos TNM en pacientes con Cancer de Pulmón No Microcítico.	12
3.1. Criterios de inclusión del estudio.	37
3.2. Criterios de exclusión del estudio.	38
4.1 Esquemas de tratamiento administrados a los pacientes con CPNM y enfermedad localmente avanzada.	41
4.2 Marcadores añadidos a las muestras para su enriquecimiento e identificación.	51
5.1. Características basales de los pacientes con CPNM.	65
5.2: Distribución de los pacientes según esquema de tratamiento.	66
5.3. Toxicidad asociada al tratamiento.	67
5.4. Respuesta clínica al tratamiento de los 60 pacientes estudiados.	68
5.5. Supervivencia según localización de la metástasis al diagnóstico	70
5.6. Supervivencia según respuesta al tratamiento.	71
5.7. Niveles de los marcadores de angiogénesis, inflamación y coagulación en pacientes con CPNM antes (n=59) y después del tratamiento (n=36) con quimioterapia y en sujetos sanos.	75
5.8. SG según los niveles basales de CECs > percentil 75 de los pacientes	79
5.9. Comparación de SG según los niveles basales de las variables (respecto al percentil 99 de los controles).	80

5.10. Comparación del ILE según las variables basales se encuentren elevadas o no respecto al valor del percentil 99 de los controles.	83
5.11. Asociación entre la progresión y los valores de las variables, en los pacientes con CPNM antes del tratamiento con quimioterapia.	87
5.12.: Estudio de correlación de Pearson entre las variables estudiadas en los pacientes con CPNM antes del tratamiento con quimioterapia.	88
5.13. Asociación entre supervivencia >15 meses (S>15m) y los valores de las variables, en los pacientes con CPNM después del tratamiento con quimioterapia	90
5.14 Sensibilidad y especificidad de las técnicas para detectar largos supervivientes	91
5.15. Comparación de ILE según las variables tras el tratamiento se encuentren elevadas o no respecto al valor del percentil 99 de los controles.	91
5.16. Asociación entre los valores de las variables tras el tratamiento según hayan recibido o no bevacizumab.	92
5.17. Modelo 1: Análisis multivariable de la influencia del Bevacizumab sobre el valor de los parámetros estudiados	93
5.18 Modelo 2: Análisis multivariable de la influencia del Bevacizumab sobre el valor de los parámetros estudiados	94
<b>Figuras</b>	
4.1. Esquema ELISA tipo sándwich.	44
4.2. Foto del Imán Magnaet Dynal MPC	49
4.3. Imagen al microscopio de fluorescencia de 2 células endoteliales	49
4.4. Adquisición de la muestra control CD133.	52
4.5. Adquisición de la muestra control CD309	54
4.6. Adquisición de muestra EPCs	55
4.7. Fórmula para cuantificar el número absoluto de células CD34 positivas	56

4.8. Cuantificación de número absoluto de CD34 positivas viables	56
4.9. Cálculo de número absoluto de EPCs en 10 mL de sangre	57
4.10. Porcentaje de muestra control CD309.	57
4.11. Porcentaje de la muestra EPCs	58
5.1. Supervivencia Global	69
5.2 Intervalo Libre de Enfermedad	69
5.3. Supervivencia global según presencia de metástasis cerebrales.	70
5.4. Supervivencia según respuesta al tratamiento	72
5.5. Supervivencia global según tratamiento con bevacizumab en pacientes con estadio IV	73
5.6 Valores de las CECs basales, tras el tratamiento y en los controles	76
5.7 EPCs basales y tras el tratamiento	77
5.8. MPs basales, tras el tratamiento y controles	78
5.9. Supervivencia global según niveles basales de las CECs	79
5.10. Supervivencia global según niveles basales de MPs	81
5.11. Supervivencia global según niveles basales de TSP1	82
5.12. ILE según niveles de MPs basales	84
5.13. ILE según niveles basales de TSP1	85

# **1- INTRODUCCIÓN**



## 1.1. Cáncer de Pulmón

### Epidemiología

El cáncer de pulmón es el tumor con mayor incidencia en los seres humanos, siendo la principal causa de muerte por cáncer en el mundo occidental<sup>1</sup>. Según datos de la OMS, en 2007 ocurrieron 1,4 millones de defunciones por esta causa en todo el mundo<sup>2</sup>. En España, alrededor de 20.000 casos de cáncer de pulmón son diagnosticados cada año, distribuidos en un 18,4% de los tumores entre los hombres (18.000 casos) y el 3,2% entre las mujeres (2.000 casos)<sup>3</sup>, siendo responsable de más de 17.000 muertes por año. La supervivencia media a los 5 años es de un 15% para todos los estadios clínicos, de un 49,5% en estadios localizados, de un 20,6% en estadios localmente avanzados y sólo de un 2,8% en la enfermedad metastásica<sup>4</sup>.

### Etiopatogenia

*Tabaquismo:* El tabaquismo es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer de pulmón. Este aumenta con la cantidad y la duración del consumo de cigarrillos. Los estudios demuestran una incidencia en EE.UU ajustada a la edad, en fumadores de 174-362 por 100.000 habitantes por año en varones y de 149-293 por 100.000 habitantes por año en mujeres, en comparación con una incidencia de 45-141 y de 65-179 por 100.000 habitantes por año en mujeres y varones fumadores pasivos, respectivamente. En contraste la incidencia en no fumadores es de 4,8-13,7 y de 14.4 a 20.8 por 100.000 habitantes por año en mujeres y varones no fumadores respectivamente. En EEUU aproximadamente el 80% de las muertes relacionadas con cáncer de pulmón se deben al tabaquismo<sup>5</sup>.

*Factores Ambientales / Exposición ocupacional:* Otros factores de riesgo en el cáncer de pulmón son la exposición ocupacional o ambiental al radón, el asbesto, metales como el cromo, cadmio, arsénico, níquel cobalto, ciertos productos químicos orgánicos, la radiación, el benzo-pireno, el benceno y el ozono<sup>6</sup>.

*Susceptibilidad genética y marcadores moleculares de pronóstico:* La susceptibilidad genética juega una importante función en el desarrollo del cáncer de pulmón, especialmente en aquellos sujetos que desarrollan la enfermedad a una edad temprana. Muchos estudios han analizado la relación entre los polimorfismos que afectan la expresión o la función de las enzimas reguladoras del metabolismo de carcinógenos y de las enzimas de reparación del ADN en pacientes con cáncer de

pulmón. Aunque no sea objeto de estudio de ésta tesis doctoral, se citan a continuación las más importantes:

El gen *p53* o *tp53*, también llamado el "guardián del genoma", se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación<sup>7</sup>. La mutación más frecuente, común a todas las histologías del carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM), es la mutación de *p53*, lo que conduce a la inestabilidad genómica, siendo la transversión más frecuente la sustitución de T por G en población fumadora (30%)<sup>8-9</sup>.

Otra mutación que se relaciona con el pronóstico en el cáncer de pulmón es la mutación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), que regula muchos procesos metabólicos y fisiológicos. En las células tumorales, la actividad de *EGFR* puede ser desregulada por diversos mecanismos oncogénicos, incluyendo la mutación del gen *EGFR*, así como el aumento del número de copias del gen y la sobreexpresión del mismo<sup>10</sup>. La activación inadecuada de *EGFR* resulta en un aumento de la supervivencia de la célula maligna, la proliferación, la invasión y la diseminación a distancia (metástasis). Estos hallazgos han proporcionado una base para el desarrollo de agentes nuevos cuyo diana es el *EGFR* son los llamados fármacos inhibidores tirosina quinasa tales como erlotinib y gefitinib<sup>11-13</sup>. Las proteínas Ras (proteínas relacionadas con la vía *EGFR* que envían señales de proliferación al núcleo) son reguladoras de la proliferación celular, la diferenciación, la motilidad y la apoptosis. Las mutaciones en la familia de los protooncogenes *RAS*, que comprende *H-RAS*, *N-RAS* y *K-RAS*, son muy frecuentes. Se han observado mutaciones (la más común en el codón 12)<sup>14</sup> del gen *KRAS* en 20% a 30% de CPNM, más comúnmente en los adenocarcinomas y en lesiones precursoras implicando un peor pronóstico<sup>15-17</sup>. Las mutaciones *KRAS* y *EGFR* parecen ser mutuamente excluyentes y pueden conferir resistencia al tratamiento basado en inhibidores tirosin quinasa<sup>18-21</sup>. Por otra parte, se han identificado mutaciones y translocaciones del gen *Anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*) en distintos tipos de cáncer, entre ellos el CPNM. *EML4-ALK* es un gen de fusión aberrante que codifica una proteína citoplasmática quimérica constitutiva con actividad quinasa. Estas mutaciones son poco frecuentes, pero su interés reside en que constituye una nueva diana terapéutica<sup>22-23</sup>.

Se han realizado múltiples estudios de marcadores moleculares pronóstico y de respuesta para entender los mecanismos de resistencia a la quimioterapia, su relación con el pronóstico y con la respuesta según su expresión en estos pacientes. Entre los más importantes se incluyen la expresión de la proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 (ERCC1), como marcador de resistencia a las sales de platino<sup>24-25</sup>, la expresión de la subunidad 1 grande de la ribonucleótido reductasa (RRM1), como marcador de resistencia a gemcitabina<sup>26-28</sup>, la tubulina clase IIIB, como marcador de resistencia a vinorelbina y a taxanos<sup>29-30</sup>, la sobreexpresión del gen cáncer de mama 1 (BRCA1), como marcador de resistencia a las sales de platino<sup>31</sup>. Así también, la determinación de los niveles de timidilato sintasa (TS), como marcador de sensibilidad a pemetrexed<sup>32-33</sup>. Sin embargo, por el momento no se ha conseguido demostrar una mejoría en la supervivencia con un tratamiento dirigido según este perfil, respecto al tratamiento estándar<sup>34</sup>.

Por tanto, existen alteraciones en los genes claramente relacionados con el desarrollo y el pronóstico del CPNM, y su estudio ha permitido desarrollar nuevos fármacos con actividad sobre la enfermedad.

#### Clasificación anatomopatológica

Desde un punto de vista clínico, el cáncer de pulmón se clasifica en dos tipos principales en función de la histología de células malignas: el carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPM) y el CPNM.

El CPM, es un subtipo cuyas células presentan esta característica (pequeñas o células en “avena”), con muy mal pronóstico y que constituye la minoría de los casos. El CPNM en cambio, es un agregado heterogéneo de tipos histológicos. Entre las más comunes se encuentran el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma indiferenciado de células grandes. Estos 3 grupos representan el 85% de los carcinomas broncogénicos, y han sido agrupados porque sus métodos de diagnóstico, estadificación, pronóstico y tratamiento fueron similares hasta hace poco tiempo<sup>35</sup>. En las Tablas 1.1 y 1.2 se detalla la clasificación histológica propuesta por la OMS en 1999 aceptada hasta la fecha y su correspondiente clasificación según grado histológico<sup>36</sup>:

#### **Tabla 1.1.** Tipos histológicos del CPNM

1-Carcinoma de células escamosas:

Papilar

Células claras

Células pequeñas

Basaloides

2-Adenocarcinoma:

Acinar.

Papilar.

Carcinoma bronquioloalveolar:

No mucinoso.

Mucinoso.

Mezcla de mucinoso y no mucinoso o de tipo celular indeterminado.

Adenocarcinoma sólido con mucina.

Adenocarcinoma con subtipos mixtos.

- Variantes.

Adenocarcinoma fetal bien diferenciado.

Adenocarcinoma mucinoso ("coloide").

Cistoadenocarcinoma mucinoso.

Adenocarcinoma de anillo de sello.

Adenocarcinoma de células claras.

3-Carcinoma de células grandes.

- Variantes.

Carcinoma neuroendocrino de células grandes.

Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado.

Carcinoma basaloide.

Carcinoma con apariencia de linfopitelioma.

Carcinoma de células claras.

Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide.

4-Carcinoma adenoescamoso

5- Carcinoma con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos.

Carcinoma de células fusiformes o gigantes.

Carcinoma fusiforme.

Carcinoma de células gigantes.

Carcinosarcoma.

Blastoma pulmonar.

6- Tumor carcinoide.

Carcinoide típico.

Carcinoide atípico.

7-Carcinoma del tipo de glándulas salivales.

Carcinoma mucoepidermoide.

Carcinoma cístico adenoide.

8- Carcinoma no clasificado

### **Tabla 1.2** Grados histológicos

Gx: no puede valorarse el grado

G1 Bien diferenciado

G2 Moderadamente diferenciado

G3 Mal diferenciado

G4 indiferenciado

#### *Lesiones pre-invasivas*

##### *Hiperplasia alveolar atípica (HAA)*

Es una lesión precursora del adenocarcinoma. Es un hallazgo típico encontrado en piezas de resección pulmonar de tumores más avanzados. Son sinónimos: hiperplasia alveolar atípica, adenoma bronquioloalveolar, e hiperplasia alveolar atípica de células cuboideas. Son lesiones que miden típicamente menos de 5 mm y están compuestos de neumocitos tipo II atípicos proliferando en la pared alveolar.

#### *Lesiones invasivas*

Los principales tipos de CPNM son el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes.

##### *Adenocarcinoma*

Se localizan radiológicamente en la periferia del pulmón e histológicamente en las pequeñas vías aéreas. El adenocarcinoma mucinoso se diferencia del adenocarcinoma colónico por su inmunohistoquímica: el anticuerpo Factor 1 de transcripción tiroideo (TTF1) es útil como marcador de tumores originarios de pulmón o de tiroides<sup>37</sup>. En cuanto al carcinoma bronquioloalveolar, existen variantes

mucinosas y no mucinosas. El tipo mucinoso se caracteriza por el crecimiento de grupos de células malignas mucinosas en las paredes alveolares. Esta variante tiende a ser multifocal. La forma no mucinosa está compuesta por neumocitos tipo II o de células claras que exhiben anaplasia nuclear y pleomorfismo mayor a HAA pero menor que otros tipos de adenocarcinoma. El tumor crece en la pared alveolar impidiendo el intercambio gaseoso ocasionando un shunt intrapulmonar<sup>38</sup>. Este subtipo de adenocarcinoma en mujeres no fumadoras asiáticas con mutaciones *EGFR* es especialmente sensible a ciertos tratamientos específicos como luego se comentará<sup>39</sup>.

Noguchi et al <sup>40</sup> describieron 5 subtipos histológicos de carcinoma bronquioloalveolar (A-E) donde el subtipo A y B se asociaban a un 100% de supervivencia ( carcinoma in situ) sin invasión de estroma ni vasos linfáticos, creciendo en el interior de la vía aérea. Un subtipo invasivo es el subtipo mixto (tipo C de Noguchi); la mortalidad para este subtipo a los 5 años es de un 20% indicando su capacidad para invadir espacios angiolímfáticos. Los subtipos D y E tienen respectivamente mayor mortalidad en relación a un alto grado histológico e invasión del estroma.

#### *Carcinoma indiferenciado de células grandes*

Está compuesto de células grandes sin diferenciación citoplasmática representando aproximadamente el 15% de todos los tipos de cáncer de pulmón. Este subtipo histológico presenta un fenotipo neuroendocrino parcial que se reconoce por su histología carcinoide, la inmunohistoquímica con cromogranina A y sinaptofisina y por la demostración ultraestructural de gránulos nucleares densos. El pronóstico es similar al del adenocarcinoma<sup>38</sup>. Aproximadamente el 50% de los carcinomas de células grandes expresa TTF1, sin embargo, raramente expresan otras citoqueratinas (CK) como la 1, 5, 10, 14 y 20<sup>41-43</sup>.

#### *Carcinoma de células escamosas*

Clínicamente se presenta como una masa pulmonar que crece en el bronquio proximal como un tumor central en estadios de displasia progresiva desde carcinoma *in situ* hasta los estadios invasivos. Histológicamente se compone de células epiteliales bronquiales con queratinización, puentes celulares o formación de perlas. En ellas se muestran los marcadores característicos relacionados con la queratinización; la

mayoría expresa la queratina de alto peso molecular, CK5 y CK6, pero no expresa TTF1<sup>44-47</sup> Además, p63 ha sido identificado como un marcador de diferenciación escamosa<sup>48</sup>

#### *Carcinoma adenoescamoso*

Es un subtipo histológico con áreas de diferenciación escamosa y áreas de adenocarcinoma. Se presentan como tumores periféricos y presentan pronóstico similar al del adenocarcinoma.

#### *Carcinomas pleomórficos*

Incluyen carcinomas con células gigantes y multinucleadas, con morfología sarcomatosa y carcinomatosa. Son variantes muy agresivas.

#### *Carcinomas de tipo glándula salival*

Incluyen al carcinoma mucoepidermoide de bajo y alto grado, el carcinoma adenoide quístico y el carcinoma de células acinares. Suelen crecer en la submucosa de los grandes bronquios.

#### *Carcinoides*

Presentan fenotipo neuroendocrino. Son tumores de bajo grado con baja incidencia de metástasis. Cuando se presentan con anaplasia nuclear, alto grado de mitosis y necrosis se clasifican como atípicos y éstos presentan un elevado riesgo de metástasis, y por lo tanto mal pronóstico<sup>41</sup>.

#### Estadificación

Clásicamente la estadificación del CPNM se ha basado en el sistema de estadificación TNM<sup>49-50</sup>. En 2009 la Union Internationale Contre le Cancer y el American Joint Committee on Cancer publicaron la séptima edición de la clasificación TNM de los tumores malignos<sup>51</sup> basada en la revisión de 100.869 pacientes procedentes de 20 países y de 45 bases de datos diferentes. En las Tablas 1.3 y 1.4 se describen las definiciones TNM según la citada clasificación y los estadios clínicos correspondientes.

### **Tabla 1.3.**Definiciones TNM

#### *Tumor primario (T)*

TX: el tumor primario no se puede evaluar o se comprobó el tumor por la presencia de células malignas en el esputo o las secreciones bronquiales, pero no se visualizó mediante imaginología o broncoscopia.

T0: no hay prueba de tumor primario.

Tis: carcinoma in situ.

T1: tumor que mide 3 cm o menos en su mayor dimensión, rodeado por pleura pulmonar o visceral, y sin prueba broncoscópica de invasión más proximal que un lóbulo bronquial

T1a: tumor menor de 2 cm

T1b: tumor entre 2 y 3 cm

T2: tumor con cualquiera de las siguientes características de tamaño o grado:

- Mayor de 3 cm en su dimensión mayor
- Compromete el bronquio principal y está a 2 cm o más de la carina
- Invade la pleura visceral

Atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hiliar, pero que no compromete todo el pulmón. Se subdivide en :

- T2a: tumor >3cm pero < o igual a 5 cm
- T2b: tumor >5 pero < 7 cm

T3: tumor > 7 cm o de cualquier tamaño que invade directamente cualquiera de los siguientes sitios: pared torácica (incluso tumores del surco superior), diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina, pero sin compromiso de la carina; o atelectasia relacionada con neumonitis obstructiva de todo el pulmón así como la presencia de nódulos adicionales en el mismo lóbulo.

T4: tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes sitios: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral, carina; o la presencia de nódulo/s adicional/es en lóbulo homolateral diferente de aquel del tumor primario

#### *Ganglios linfáticos regionales (N)*

- NX. Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar.
- N0. No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
- N1. Metástasis en los ganglios linfáticos peri bronquiales ipsilaterales o los ganglios linfáticos hiliares ipsilaterales, y ganglios intrapulmonares comprometidos por extensión directa del tumor primario

- N2. Metástasis en el/los ganglio(s) linfático(s) mediastínico(s) ipsilateral(es) o en el/los ganglio(s) linfático(s) subcarinal(es).
- N3. Metástasis en el/los ganglio(s) linfático(s) mediastínico(s) contralateral(es), hilar(es) contralateral(es), escaleno(s) ipsilateral(es) o contralateral(es), o supraclavicular(es).

*Metástasis a distancia (M)*

- MX. No se puede evaluar una metástasis a distancia.
- M0. No hay metástasis a distancia
- M1. Se subdivide: .
  - M1a: nódulo tumoral separado en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) maligno.
  - M1b: metástasis a distancia.

**Tabla 1.4.** Clasificación de los estadios clínicos TNM en pacientes con CPNM

Estadio clínico	Tumor primario (T)	Afectación ganglionar regional (N)	Metástasis a distancia (M)
Carcinoma oculto	Tx	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1a, T1b	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T1a, T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Estadio IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Estadio IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1a, M1b

### Diagnóstico

Una historia clínica detallada que incluya los datos sobre tabaquismo, exposición ocupacional e historia familiar son fundamentales para orientar el diagnóstico, así como un examen físico completo.

### Técnicas no invasivas

*Citologías de esputo:* es una prueba útil en el paciente cuyo estado general limita la realización de técnicas invasivas para llegar al diagnóstico. La sensibilidad y especificidad de la técnica (3 muestras de la primera expectoración de la mañana) es del 69% y del 96% respectivamente. La correlación cito-histológica de los diferentes

tipos de carcinoma es elevada siendo de una 96.5% para carcinoma microcítico, 95.3% para carcinoma escamoso, 87.8% para adenocarcinoma y 81.4% para carcinoma de células grandes.<sup>52</sup>

La *tomografía axial computarizada de tórax y abdomen superior* tiene una sensibilidad del 60% y una especificidad del 80% en la detección del cáncer de pulmón; con equipos de mayor resolución esta sensibilidad y especificidad puede alcanzar el 85% y el 100% respectivamente en la detección de tumores endoluminales.<sup>53-54</sup>

La *tomografía por emisión de positrones (PET)* que utiliza la fluorodeoxiglucosa 18 como marcador, es muy útil en el diagnóstico diferencial del nódulo pulmonar solitario y para la valoración de afectación adenopática mediastínica. La precisión global, sensibilidad y especificidad de esta técnica es del 70%, 70% y 80% respectivamente<sup>55</sup>.

#### Técnicas invasivas

La *Broncoscopia flexible* con aspirado del lavado bronquial y biopsia transbronquial juega un papel importante en el diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón con una sensibilidad del 50% para masas periféricas y del 37% para nódulos pulmonares<sup>56-57</sup>. Por otra parte la sensibilidad de la biopsia transbronquial en la estadificación del mediastino en el meta-análisis de Holty et al<sup>58</sup>, fue del 39% (95% CI, 17-61%), y la especificidad combinada fue del 99%(95% IC, 96-100%).<sup>59</sup>

El *EBUS ( Endobronchial Ultrasound for the diagnosis and staging of luna cancer)*: es una técnica mínimamente invasiva que permite al broncoscopista la visualización por ultrasonido de la lesión a través del lumen de la vía aérea. Permite definir el grado de invasión local en lesiones que afecten la vía aérea y facilita el diagnóstico de lesiones periféricas. Su principal utilidad radica en guiar la biopsia transbronquial de ganglios hiliares y mediastínicos para una correcta estatificación donde las técnicas de imagen como la TAC y la PET presentan limitaciones en el diagnóstico con una sensibilidad y especificidad del 51 y 85% y del 74 y 85% respectivamente<sup>59</sup>. La sensibilidad y especificidad del EBUS se vio en un análisis de 12 estudios siendo de 93% y del 100% respectivamente con falsos negativos del 9% rango (1-37%).

La *punción aspiración transtorácica guiada por TAC o fluoroscopia* es una técnica útil en lesiones periféricas donde la biopsia transbronquial no ha conseguido

el diagnóstico, con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 97%. La complicación más frecuente de este procedimiento es el neumotórax (25-30%)<sup>60</sup>.

La *mediastinoscopia* es considerada el método estándar para la estadificación ganglionar mediastínica, pero es un procedimiento quirúrgico y por tanto presenta mayor riesgo que las técnicas no invasivas<sup>61</sup>.

La *toracoscopia video-asistida* tiene su indicación en lesiones periféricas menores de 2 cm de diámetro, en tumores pleurales o derrame pleural.

Por último la *toracotomía diagnóstica* estará indicada en pacientes operables con tumores iniciales en las técnicas de imagen y aparentemente resecables<sup>62</sup>.

#### Evaluación funcional

*Estado de actividad o Performance status (PS)*: es una medida general, del estado funcional del paciente. Mide el impacto de los síntomas del tumor junto con la co-morbilidad, en la vida diaria de un paciente y su capacidad de autocuidado. Además, constituye un factor pronóstico independiente en CPNM. Varias escalas están disponibles para uso clínico, entre ellos, las más comúnmente utilizadas son la escala de Karnofsky<sup>63</sup>, y la del Eastern Cooperative Group (ECOG)<sup>64</sup>, esta última con una escala del 0 al 5 en función del nivel de los síntomas, la interferencia con la actividad normal y la proporción de las horas de vigilia pasado en la cama. De acuerdo con esta última escala, los pacientes con PS 0-1 son aquellos que mantienen una actividad plena y se encuentran asintomáticos o los síntomas no les limitan su actividad diaria. Estos pacientes son candidatos a tratamiento según el estadio clínico con cirugía o a tratamientos con quimioterapia basados en sales de platino, asociados o no a radioterapia externa concomitante como se comentará más adelante. En cambio aquellos pacientes con PS2 encuentran limitaciones en la actividad física y precisan reposo en cama aunque menos del 50% del día. Para este grupo de pacientes la valoración del tratamiento se debe realizar de forma individualizada<sup>65</sup>.

*Función Pulmonar*: Las pruebas de función respiratoria son imprescindibles para la valoración quirúrgica e incluyen la *espirometría*, y la *medición de la difusión del anhídrido carbónico (DLCO)*. Pacientes con un FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) o DLCO menor de 80 % requerirán pruebas adicionales para valorar la reserva post-resección pulmonar, que incluyen gammagrafía de ventilación/

perfusión, test de esfuerzo cardiopulmonar y gasometría. Pacientes con una FEV1 o DLCO prevista post-operatoria < 40% y un VO2 máximo menor de 10 ml/ min o una saturación < 90% presentan mayor riesgo de complicaciones perioperatorias o muerte<sup>66</sup>.

#### Estudio de extensión

Las localizaciones más frecuentes de metástasis a distancia incluyen el sistema nervioso central, hígado, huesos, pulmones y glándulas suprarrenales. Para su detección son de utilidad la tomografía craneal con contraste o la resonancia magnética cerebral (si se sospecha metástasis cerebral), la gammagrafía ósea (si se sospecha de metástasis óseas), la ecografía hepática( si se sospecha de metástasis hepáticas), la tomografía o resonancia magnética abdominal (para descartar lesiones hepáticas y adrenales) y la PET/TAC( útil para estadificar las adenopatías mediastínicas y en el abordaje terapéutico curativo). Habitualmente el estudio inicial de extensión incluye una tomografía axial computarizada de tórax y abdomen superior<sup>67</sup>.

#### Tratamiento

*Tratamiento en estadios iniciales:* El tratamiento estándar es la cirugía. Durante la misma, debe tomarse biopsia o extirparse al menos 3 estaciones ganglionares ó 6 ganglios para afirmar un diagnóstico pN0<sup>68</sup>. La supervivencia a 5 años para los pacientes tras la resección completa, estadios IA y IB alcanza el 78% y 58% respectivamente, el 46% y 36% para los estadios IIA y IIB respectivamente, y el 24% para el estadio IIIA<sup>69</sup>. La causa más frecuente de muerte tras la resección completa se debe a la aparición de metástasis a distancia que ocurre en un 15% de los pacientes con estadio IA y alcanza un 60% en pacientes con estadio IIIA, debido a micrometástasis ocultas previas a cirugía. El tratamiento con quimioterapia temprana, mejoraría la supervivencia al erradicarlas. Se han realizado estudios tanto en neoadyuvancia (quimioterapia previa a cirugía) como en adyuvancia (tras la cirugía) para conseguir dicho objetivo.

*Papel de la quimioterapia neoadyuvante:* El objetivo de administrar la quimioterapia previa a cirugía es reducir el riesgo de metástasis a distancia tras la misma, eliminando la micrometástasis oculta, así como reducir el volumen del tumor primario, las adenopatías locales y recibir el tratamiento con una mejor tolerancia que

permita evitar reducciones de dosis y retrasos. La desventaja de esta estrategia es demorar la cirugía con intención curativa.

El entusiasmo por el empleo de la quimioterapia neoadyuvante surgió a partir de 2 estudios positivos de quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino: el estudio de Roth et al<sup>70</sup>, con una mediana de supervivencia de 21 meses vs 14 meses en la rama de quimioterapia seguida de cirugía y cirugía sólo respectivamente, y el estudio de Rosell et al<sup>71</sup>, con similares resultados (mediana de supervivencia de 22 meses vs 10 meses). Ambos estudios asociaron radioterapia mediastínica postoperatoria. En 2001, los resultados de otro estudio francés fase III, mostraba un beneficio clínico con una ganancia en supervivencia de 11 meses (37 vs 26 meses de mediana de supervivencia), sin un aumento significativo de la mortalidad postoperatoria. No hubo diferencias entre las tasas de recaída local<sup>72</sup>. Posteriormente, se realizaron estudios para contestar a la pregunta: ¿Es mejor administrar la quimioterapia antes o después de la cirugía? Un meta-análisis encontró resultados similares en cuanto a supervivencia global (SG) y a intervalo libre de enfermedad (ILE) en los pacientes con tumores resecables que recibieron quimioterapia neoadyuvante o quimioterapia adyuvante<sup>73</sup>. Felip et al presentaron en ASCO 2009 los resultados del estudio NATCH<sup>74</sup>, ensayo multicéntrico, fase III de pacientes asignados al azar a cirugía sola, quimioterapia neoadyuvante seguida de cirugía o cirugía seguida de quimioterapia adyuvante. Este estudio reclutó a 624 pacientes con estadio clínico inicial estadio IA, IB, II o T3N1. Los pacientes en tratamiento neoadyuvante y adyuvante recibieron quimioterapia basada en 3 ciclos de platinos y taxanos cada 3 semanas. El objetivo primario fue el ILE a los 5-años. Tras un seguimiento medio de 43 meses, no hubo diferencias significativas entre los tres brazos (28, 32, y 24 meses para cirugía, quimioterapia neoadyuvante y quimioterapia adyuvante respectivamente). El ILE a los 5-años también fue similar entre los 3 grupos y tampoco hubo diferencias significativas en la mediana de SG.

*Estudios en adyuvancia:* Se han realizado múltiples ensayos clínicos y metaanálisis para valorar el beneficio de la adyuvancia respecto a la cirugía sólo. En 1995, el NSCLCCG publicó un metanálisis mostrando un beneficio de la adyuvancia de 5% de ganancia en supervivencia respecto a la cirugía sola. Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, este estudio motivó el desarrollo de nuevos

ensayos clínicos<sup>75</sup>. Tres ensayos randomizados fase III basados en quimioterapia con sales de platino demostraron el beneficio clínico de la adyuvancia: el IALT<sup>76</sup>, el JBR.10<sup>77</sup> y el ANITA<sup>78</sup>, con un rango de ganancia en supervivencia del 4,1% al 15% en los 3 estudios. En una publicación de seguimiento del IALT<sup>79</sup>, se vio que tras 7 años la ganancia de supervivencia inicial del 4% a 5 años, no se mantenía debido a muertes relacionadas con cáncer en la rama con quimioterapia adyuvante. En contraste, el análisis de seguimiento del JBR.10 presentado en ASCO 2009<sup>80</sup>, mostraba que el beneficio se mantenía tras 9 años de seguimiento. Así mismo, se observó un beneficio mantenido en el ensayo ANITA tras 7 años de seguimiento<sup>81</sup>. El metaanálisis LACE incluyó 4584 pacientes de 5 ensayos clínicos (entre ellos estaban incluidos los 3 que se comentaron previamente) y concluyó que existe un beneficio clínico en la SG del 5.4% y del ILE del 5.8% al administrar quimioterapia basada en cisplatino tras la cirugía para pacientes con estadio II y III<sup>82-3</sup>.

El NSCLC meta-analysis collaborative group publicó recientemente<sup>84</sup> los resultados de un meta-análisis basado en 34 estudios (8447 pacientes) sobre el beneficio de la quimioterapia adyuvante respecto a la cirugía sola. Se observó una ganancia en la supervivencia a los 5 años del 4%. En esta misma publicación se incluyó un segundo análisis del beneficio de la quimioterapia adyuvante respecto a la cirugía asociada a radioterapia basado en 13 estudios (2660 pacientes). Se observó un beneficio en la supervivencia a los 5 años del 4% a favor de la quimioterapia adyuvante para los pacientes con estadios II y III. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos esquemas de quimioterapia incluidos. Los resultados no fueron concluyentes para los pacientes con estadio IA y IB. Sobre este punto, las guías clínicas de la ASCO sostienen que no existe suficiente evidencia científica hasta la fecha que demuestre un beneficio de la quimioterapia adyuvante en estadio<sup>85-6</sup>.

En definitiva, está claro que tanto la quimioterapia neoadyuvante como la adyuvante aportan beneficio clínico para los pacientes con estadio IB, II y III resecables, pero la evidencia científica actual es más sólida y está a favor de la adyuvancia<sup>87</sup>.

*Papel de la radioterapia:* El tratamiento adyuvante con radioterapia (PORT) tras la resección completa fue el estándar de tratamiento en la pasada década aunque su beneficio clínico fue cuestionado. En 1998, se presentó un meta-análisis de 9 ensayos clínicos randomizados, criticado por incluir estudios heterogéneos en cuanto a técnicas de irradiación ya desfasadas (1965) y equipos de cobalto junto con las actuales técnicas y equipos modernos y concluyó que la radioterapia post-operatoria no mejoraba el pronóstico de los pacientes N0, N1, siendo incluso la supervivencia peor para la rama que recibió radioterapia en estos grupos de pacientes<sup>88-9</sup>. En un análisis de la Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) basado en 7465 pacientes con estadio II y III tras una mediana de seguimiento de 3,5 años no se observó un beneficio clínico de la radioterapia adyuvante en el análisis multivariable; en el análisis por subgrupos, sí se vio un beneficio en la supervivencia para pacientes con enfermedad N2 (HR 0,855 p=0,0077)<sup>90</sup>. Así mismo en el ensayo ANITA, del total de 840 pacientes, 232 recibieron radioterapia postoperatoria. El ensayo recomendaba su administración si había enfermedad ganglionar positiva, pero no era mandatoria por protocolo. En el análisis de este subgrupo se vio que en caso de enfermedad N2 la radioterapia añadía beneficio a la supervivencia tanto a la rama de cirugía sólo como a la rama de quimioterapia adyuvante<sup>81</sup>.

Según recomendaciones de la ESMO<sup>91</sup>, la radioterapia está indicada en pacientes intervenidos con resección no radical (R1) y en pacientes con estadio IIIA y afectación ganglionar mediastínica N2. El estudio randomizado fase III Lung Adjuvant Radiotherapy Trial, que incluye pacientes con enfermedad N2, basado en radioterapia conformada tridimensional se diseñó para detectar una diferencia del 10% en 3 años del ILE como objetivo primario y probablemente aclarará el beneficio real que aporta este tratamiento<sup>92</sup>.

El papel de la radioterapia asociada a la quimioterapia en la inducción en N2 microscópica es una pregunta por contestar. Sólo existe un estudio realizado por Fleck et al. en Brasil presentado en un abstract en 1994, donde la rama que asociaba radioterapia era mejor que la rama de quimioterapia sola<sup>93</sup>.

Tratamiento en estadios avanzados

*Enfermedad localmente avanzada, ESTADIO III B:* El tratamiento estándar actual es la quimioterapia-radioterapia concomitante radical basada en dobletes con platino<sup>94</sup>. Inicialmente se realizaron 4 ensayos clínicos basados en cisplatino en diferentes dosis en monoterapia. De los mismos se pudo concluir que la dosis de radioterapia debe ser superior a 45 Gy y que el esquema de cisplatino administrado 5 días a la semana, aumentaba la radiosensibilidad de la radioterapia y se conseguía un mejor control locoregional aunque no se pudo demostrar un beneficio en la supervivencia global<sup>95-8</sup>. También se realizaron ensayos con carboplatino en monoterapia concomitante con la radioterapia, siendo negativos para la rama de tratamiento combinado<sup>99</sup>.

Posteriormente se desarrollaron 4 ensayos que compararon el tratamiento secuencial frente a la quimioradioterapia concomitante. El primero de ellos fue un ensayo del grupo japonés<sup>100</sup>, en un protocolo que combinaba quimioterapia basada en mitomicina + vindesina + cisplatino asociada a radioterapia 56Gy con fraccionamiento convencional, en tratamiento concomitante vs secuencial. Se observó una mejoría en la supervivencia global de 16,5 meses vs 13,3 meses para la rama de tratamiento concomitante ( $p=0,04$ ) y una ganancia en el intervalo libre de progresión a favor del tratamiento concomitante. El segundo estudio, llevado a cabo por la RTOG<sup>101</sup>, se incluyeron 611 pacientes aleatorizados en 3 brazos diferentes de tratamiento secuencial frente a concomitante y distintas dosis de fraccionamiento de radioterapia; también se demostró un beneficio en la supervivencia global a favor del tratamiento concomitante respecto al secuencial (21% y 12% de supervivencia a 4 años respectivamente). Un tercer ensayo lo desarrolló el grupo alemán<sup>102</sup> que incluyó 219 pacientes randomizados a 2 ramas de tratamiento que asociaba quimioterapia con un esquema que asociaba carboplatino y taxol (éste último en administración semanal) y radioterapia concomitante frente a secuencial respectivamente. Este estudio no demostró beneficio en la SG, pero sí del ILE. Por último, el grupo francés<sup>103</sup> incluyó 205 pacientes aleatorizados a tratamiento secuencial frente a concomitante con quimioterapia basada en doblete con cisplatino; este estudio mostró una mejor supervivencia a favor del tratamiento concomitante aunque no estadísticamente

significativa. La dosis de radioterapia administrada en fraccionamiento estándar en los citados ensayos fue de 60-66 Gy.

También, se ha estudiado si la consolidación con quimioterapia tras el tratamiento concomitante mejora la supervivencia; en ese sentido se presentó en ASCO 2007 un estudio<sup>104</sup> de 250 pacientes, basado en cisplatino+etopósido asociado a radioterapia concomitante seguido o no de docetaxel en monoterapia. Este estudio mostró un perfil de toxicidad elevado en la rama de consolidación con docetaxel y una peor supervivencia para este grupo (21,5 y 24,1 meses, respectivamente).

Por otra parte, se han realizado estudios<sup>105-7</sup> que valoraron la quimioterapia de inducción previa al tratamiento concomitante, aunque ninguno ha mostrado un beneficio a favor de esta modalidad de tratamiento.

Actualmente está en estudio si dosis de radiación mayores u otras alternativas de fraccionamiento de dosis son mejores que el tratamiento estándar y si la asociación con tratamientos dirigidos como el cetuximab o el bevacizumab mejoran las respuestas.

*ESTADIO IV:* La quimioterapia es superior al mejor tratamiento de soporte en pacientes con estado funcional  $\leq 2$ . Se ha demostrado que la quimioterapia en el CPNM avanzado prolonga la supervivencia y mejora la calidad de vida del paciente. Sin embargo, la mayoría de ellos mueren en los primeros 2 años tras el diagnóstico<sup>108</sup>. La terapia estándar para pacientes con enfermedad en estadio avanzado está basada en dobletes con platino. Los ensayos que compararon las combinaciones basadas en platino, en general, revelaron la misma eficacia con distinto perfil de toxicidad<sup>109</sup>. El estándar actual de tratamiento es una sal de platino en combinación con otro fármaco, por lo general paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, o pemetrexed<sup>110-14</sup>.

Los pacientes con histología de adenocarcinoma tienen un mejor pronóstico y una supervivencia con diferencias de hasta el 8% en el seguimiento a un año respecto al carcinoma epidermoide. Esta diferencia se conoció a partir de los resultados de los ensayos clínicos de aprobación del erlotinib, gefitinib y pemetrexed durante el periodo 2002-2005<sup>115-7</sup>, lo que ha demostrado que el tipo celular representa una variable

importante en la toma de decisión terapéutica. Los tratamientos dirigidos como erlotinib, gefitinib, (inhibidores tirosina kinasa) y bevacizumab (anticuerpo anti-VEGF) como luego se comenta, son más seguros y efectivos en pacientes con adenocarcinoma. Estos datos han llevado a elegir el tratamiento óptimo de primera línea del CPNM avanzado en base al diagnóstico histológico. Por lo tanto, este nuevo escenario plantea un problema importante en el manejo de estos tumores precisando de un diagnóstico específico del subtipo histológico<sup>118-9</sup>.

## **1.2 .Angiogénesis**

### Angiogénesis tumoral, fisiopatología

Estudios previos demostraron que la formación de vasos sanguíneos del tumor se desarrolla mediante un proceso de angiogénesis, es decir, la formación de nuevos capilares por coaptación o aparición de brotes, a partir de los ya existentes. La evidencia reciente ha demostrado que la neovascularización tumoral puede darse por el reclutamiento de células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea, en un proceso llamado vasculogénesis<sup>120-4</sup>. Cuando un tumor alcanza el tamaño de 1.2 mm<sup>3</sup>, el oxígeno y los nutrientes son incapaces de llegar hasta las células tumorales. Las propias células tumorales, envían señales a través de proteínas proangiogénicas que inducen el rebrote de capilares preexistentes, dando lugar a la formación de nuevos vasos.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una molécula clave en la regulación al alza de la angiogénesis tumoral. El VEGF es una proteína de señal reguladora de la angiogénesis tanto fisiológica como patológica. Se presenta con cuatro isoformas diferentes que tienen actividades biológicas similares, pero difieren en la biodisponibilidad y afinidad a sus receptores. *In vitro*, se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. El VEGF también es un potente vasodilatador. La familia del VEGF integra 5 miembros: VEGF-A, VEGF-B; VEGF-C, VEGF-D y PlGF (placental growth factor). Estas proteínas interactúan con sus respectivos receptores (VEGFR1-3) mediando funciones angiogénicas: en condiciones fisiológicas el VEGFR1 se une al VEGF con una fuerte afinidad. Es esencial durante el

desarrollo embrionario, donde interviene en el reclutamiento de las células progenitoras de la médula ósea para la formación de neovasos. Entre las funciones de VEGFR2 al unirse al VEGF se incluyen el envío de señales de angiogénesis tales como migración, proliferación y aumento de la permeabilidad vascular. VEGFR3 interviene en el proceso de remodelación de los vasos sanguíneos<sup>125</sup>. En condiciones patológicas, es bien conocido que el VEGF interviene en el proceso de angiogénesis y carcinogénesis por una regulación a la alza<sup>126</sup>. Los anticuerpos anti-VEGF tienen la capacidad de suprimir el crecimiento tumoral<sup>127</sup>.

#### Inhibidores de la angiogénesis, bevacizumab

El estudio de la angiogénesis ha llevado a avances en el tratamiento de diferentes tumores. El bevacizumab, es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante contra el VEGF, que ha demostrado actividad clínica relevante en diferentes tipos de cáncer, y en particular en el CPNM<sup>128</sup>. En combinación con quimioterapia mejora las tasas de respuesta y la supervivencia en varios tumores como el colorrectal, pulmón, mama, ovario y riñón<sup>129</sup>.

En CPNM, varios ensayos clínicos de fase II mostraron un beneficio en el ILE, al añadir bevacizumab al tratamiento basado en platinos, docetaxel, pemetrexed o erlotinib<sup>130-2</sup>. Posteriormente se diseñaron dos estudios fase III, uno norteamericano y uno europeo, que compararon la quimioterapia estándar sola o con bevacizumab. Se observó un aumento significativo en el ILE y la SG en la rama de la terapia combinada en el estudio norteamericano, y un aumento del ILE en el estudio europeo<sup>133-4</sup>.

En resumen, la introducción del instrumental antiangiogénico, bevacizumab, principalmente, pero también de ITK ha traído consigo una nueva era en el tratamiento del CPNM. Sin embargo, sólo una fracción de los pacientes parece beneficiarse de las mismas. Por otra parte, la evaluación de la respuesta del tumor a estos medicamentos es más difícil que en el caso de la quimioterapia convencional, ya que las terapias dirigidas, en general, no producen una reducción del tumor rápida y fácilmente mensurable, sino más bien consiguen largas estabilizaciones, y cambios de la densidad y del contraste en las pruebas de imagen.

#### Células endoteliales circulantes y células endoteliales progenitoras en el cáncer

Dado el importante papel de la angiogénesis en oncología, como un mecanismo patogénico y como un objetivo para el tratamiento, existe una creciente necesidad de disponer de marcadores que reflejen con precisión la actividad angiogénica del tumor y los efectos del tratamiento que afectan a la vasculatura tumoral. Un candidato prometedor como marcador potencial en ambos aspectos es el recuento de células endoteliales circulantes. Hace más de 35 años se observó la presencia de células endoteliales en la sangre<sup>135</sup>. Estudios realizados durante la última década indican que el fenotipo endotelial expresado por las células muestran una amplia gama de características diferentes<sup>136-7</sup>. Las células endoteliales circulantes (CECs) tienen un fenotipo compatible con células diferenciadas, en algunos casos apoptóticas o necróticas, y por lo tanto más probablemente derivadas de las paredes del vaso. Por otra parte, existen células progenitoras circulantes que expresan antígeno endotelial, y fueron considerados como células progenitoras endoteliales (EPCs). Para la caracterización de las CECs y EPCs, se han utilizado la citometría de flujo y técnicas inmunomagnéticas combinadas con la microscopia de fluorescencia<sup>37- 138</sup>. Otro método para cuantificarlas es la PCR cuantitativa, con mayor sensibilidad pero menor especificidad que la citometría de flujo de 4 canales<sup>139</sup>. Las células endoteliales circulantes representan una población de células maduras diferenciadas endoteliales, que son descamadas de la íntima de los vasos sanguíneos a la circulación sanguínea. Su fenotipo se caracteriza por la expresión de DNA/Syto16<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD31<sup>+</sup>, CD146<sup>140</sup>. Dada la escasez extrema de CEC en personas sanas, el aumento de su número podría indicar la presencia de daño endotelial o disfunción<sup>141</sup>. El aumento del número de CEC se ha documentado en diferentes tipos de cáncer<sup>142</sup>. Los niveles circulantes de células endoteliales en pacientes con cáncer pueden reflejar la tasa de rotación anormal del endotelio, así como la naturaleza desordenada de la angiogénesis tumoral relacionada con el volumen tumoral vascular<sup>143</sup>. Las EPCs son un subconjunto de células CD34<sup>+</sup> (células madre pluripotentes) y se caracterizan por un fenotipo endotelial que se define por la expresión de CD34, CD133 y VEGFR2 (KDR)<sup>144</sup>. Estas células progenitoras aparecen en la circulación periférica, debido a las señales de activación derivadas del tumor<sup>145</sup>. Las EPCs podrían representar un nuevo objetivo para intervenciones pro-o anti-angiogénicas, sin embargo, la contribución de la EPC con la angiogénesis del tumor sigue siendo cuestionada. Un estudio reciente sugiere que la progresión del

tumor durante la vascularización se produce principalmente a través de la angiogénesis tumoral clásica, mientras que las EPC no se incorporan en la pared del vaso<sup>146</sup>. Estudios preclínicos y clínicos sugieren que el recuento de CECs podría ser útil para definir la mejor opción de tratamiento para los pacientes que son candidatos a terapia antiangiogénica<sup>147</sup>, mientras que las EPCs parecen tener una función catalizadora<sup>148</sup> al estimular el crecimiento de micro y macro-metástasis, en la promoción de la angiogénesis durante el crecimiento del tumor, y en la revascularización después de ciertos tratamientos<sup>149-52</sup>.

Se ha observado que los niveles crecientes de CECs son un indicador de progresión en pacientes con diferentes tumores<sup>153</sup>. Con respecto a EPCs, en un estudio de cáncer de mama se midieron los niveles de estas células antes y después del primer ciclo de la quimioterapia. Se observó que en pacientes con estadio III y IV de la enfermedad los niveles eran significativamente superiores que en las pacientes con estadio I y II de la enfermedad. Además, en pacientes con enfermedad avanzada, los niveles de EPC descendieron significativamente tras la quimioterapia<sup>154</sup>.

Las células endoteliales circulantes y las células progenitoras endoteliales en pacientes con CPNM

Hay pocos trabajos actuales en la literatura sobre la importancia clínica de las CEC y CEPCs en CPNM. Kawaishi et al<sup>155</sup> realizaron un estudio con 31 pacientes y encontraron niveles elevados de CECs en pacientes con CPNM y voluntarios sanos. Niveles basales elevados de CECs se asociaron a un mayor ILE. Los niveles de la CECs disminuyeron significativamente después de la quimioterapia y se observó una asociación entre esta disminución y la respuesta al tratamiento. Por otra parte, se observó una disminución estadísticamente significativa de las CECs, el día 22, en aquellos pacientes con respuesta parcial.

En otro estudio con 53 pacientes con CPNM, se encontraron niveles basales de EPCs significativamente elevados en comparación con los controles sanos. Además, los niveles elevados de estas células se asociaron a una peor supervivencia<sup>156</sup>. También se ha demostrado una asociación entre el nivel de las EPCs, con el estadio clínico y la progresión<sup>157</sup>. Por otra parte, Hilbe et al analizaron la expresión CD133 en muestras

tumorales frescas, como marcador de CPECs encontrando un gran número de células CD133<sup>+</sup> en 43 de 63 muestras y una correlación con la expresión de VEGFR-2<sup>157</sup>.

Utilidad de la medición de las CECs y EPCs en pacientes con terapia antiangiogénica

En la actualidad, la terapia antiangiogénica juega un papel importante en el tratamiento de muchos tumores. Debido a su mecanismo de acción, parece razonable esperar que estos tratamientos tengan algún efecto sobre los niveles de CEC y CPECs. Sin embargo, en la actualidad hay pocos estudios que busquen la relación de estas células y la terapia antiangiogénica en pacientes con cáncer. Recientemente, dos estudios han analizado las EPCs y las CECs en pacientes con CPNM tratados con fármacos antiangiogénicos. Un estudio<sup>158</sup> incluyó 3 grupos de tratamiento: un grupo de 25 pacientes fueron tratados con erlotinib + sorafenib, un segundo grupo de 18 pacientes fueron tratados con erlotinib + bevacizumab y el tercer grupo de 10 pacientes recibió tratamiento con erlotinib solo. A los 7 días, se observó un aumento de 3 veces el número de las CECs en el grupo tratado con erlotinib + sorafenib, así como en el grupo tratado con erlotinib + bevacizumab, pero no en el grupo tratado con erlotinib solo. Los autores también encontraron que el número de CPECs disminuyó 7 días después de iniciar el tratamiento con erlotinib + sorafenib, pero no en los otros grupos. Además, los pacientes en el grupo de erlotinib + sorafenib que respondieron al tratamiento, tenían menores niveles basales de CPECs, y un nivel menor de CPECs se correlacionó con un mayor tiempo hasta la progresión, lo que indica la posible función del nivel de CPECs como predictor de la respuesta. Por otra parte, el estudio de Wang et al analizó los niveles de CEC en pacientes con CPNM antes y después del tratamiento con quimioterapia, con o sin un fármaco anti-angiogénico (endostar). Se observó una disminución estadísticamente significativa de estas células en los pacientes que respondieron a la terapia de combinación. También se observó que los niveles crecientes de CEC se correlacionaron negativamente con el tiempo hasta la progresión<sup>159</sup>.

Por tanto, los estudios sugieren que existe una asociación con el pronóstico y una variación de sus niveles tras el tratamiento y una posible asociación con la

respuesta. No existen datos sobre esta asociación en pacientes con CPNM tratados con quimioterapia + bevacizumab.

Hipercoagulabilidad en pacientes con cáncer.

*Papel de las Micropartículas (MPs):* El tromboembolismo venoso es una complicación frecuente en los pacientes oncológicos. Sin embargo la patogénesis de la hipercoagulabilidad en el cáncer no está completamente establecida. Una de las causas de la activación de la coagulación en esta patología es el incremento de la expresión de proteínas pro-coagulantes, como el factor tisular (FT). El TF es el iniciador más importante de la coagulación, que se localiza en el endotelio vascular, en las células sanguíneas, en distintos tejidos incluido el pulmonar<sup>160</sup>, en las células tumorales y en las MPs derivadas de plaquetas, de células endoteliales y de células tumorales<sup>161</sup>.

Las MPs son vesículas celulares  $\leq 1,5 \mu\text{m}$  que se producen en el proceso de daño vascular, apoptosis y activación celular. La actividad procoagulante de las micropartículas se debe a la exposición de fosfolípidos, principalmente fosfatidilserina, y de proteínas de coagulación, como el FT<sup>162-3</sup>. En condiciones fisiológicas, la concentración de FT y de MPs en sangre es mínima. Sin embargo, en ciertas condiciones asociadas a activación celular y daño vascular, se puede producir un aumento de MPs (endoteliales y de células sanguíneas) y de FT<sup>164</sup>, que pueden inducir un estado protrombótico<sup>165</sup>. En pacientes con diferentes tipos de cáncer se han encontrado niveles elevados de MPs asociado a estados protrombóticos<sup>166-7</sup>. El perfil fenotípico puede variar considerablemente dependiendo de si provienen de células que fueron activadas, cuyo marcador sería el CD62E o de células que sufrieron apoptosis (positivas a CD31). La técnica más utilizada para identificarlas es la centrifugación combinada con la citometría de flujo<sup>168-9</sup>. Otra técnica para medir su actividad procoagulante, se realiza mediante un ensayo de generación de trombina<sup>170-1</sup>. La detección de MPs puede ser de utilidad como marcador patogénico de desórdenes trombóticos y de daño vascular<sup>172</sup>.

El estudio de las MPs en pacientes con CPNM es de interés para valorar su posible utilidad como marcador pronóstico y de respuesta, así como su relación con los eventos trombóticos.

Marcadores de angiogénesis, inflamación y coagulación en CPNM.

Se han realizado estudios para demostrar si los niveles séricos del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A) se correlacionan con el pronóstico en pacientes con CPNM. Muchos estudios demuestran esta correlación, encontrando niveles más altos en los estadios avanzados respecto a los iniciales, asociados a menor supervivencia<sup>173-6</sup>. También se estudió la expresión de VEGF-A en tejido tumoral por inmunohistoquímica y se encontró que una fuerte expresión de VEGF-A se asociaba a un peor pronóstico<sup>177</sup>.

El receptor soluble 1 del VEGF (sVEGF-R1) fue estudiado por Yilmaztepe et al<sup>178</sup> en pacientes con CPNM, encontrando una correlación inversa entre sus niveles y la respuesta al tratamiento. Otro estudio efectuado por Decaussin et al<sup>179</sup> en tejido tumoral de pacientes con CPNM, por inmunohistoquímica, encontró una fuerte expresión del VEGF-A, el VEGF-R1 y receptor 2 del VEGF (VEGF-R2) en células tumorales, fibroblastos y células endoteliales, sin poder establecer una relación con el pronóstico.

Las trombospondinas comprenden un grupo de proteínas homólogas que regulan el fenotipo celular y su matriz durante el proceso de formación del tejido y su remodelación. Entre ellas, la trombospondina-1 (TSP1) es una potente proteína inhibidora del crecimiento vascular. En el microambiente tumoral, al disminuir sus niveles se elevan los niveles del factor de transformación de crecimiento beta (TGFB) así como los niveles del VEGF favoreciendo la migración y supervivencia de la célula endotelial, y el crecimiento tumoral<sup>180-5</sup>.

Se ha estudiado la asociación de la disminución de los niveles séricos de TSP1 y el pronóstico en CPNM así como su expresión en tejido tumoral. Dudek AZ et al<sup>186</sup> estudiaron los niveles séricos de VEGF y TSP1 en pacientes con CPNM antes y después del tratamiento y en sujetos sanos. Los niveles séricos de VEGF eran mayores en pacientes con CPNM que en sujetos sanos y sus niveles se correlacionaron con la

supervivencia. Los pacientes con niveles de VEGF pretratamiento > 500 pg/ml presentaron una mediana de supervivencia de 6 meses, mientras que aquellos con niveles < 500 pg/ml presentaron una mediana de supervivencia de 11 meses ( $p < 0,03$ ). Los niveles séricos de TSP1 eran menores en los pacientes con CPNM respecto a los controles sanos. Mascaux et al<sup>187</sup> han estudiado la expresión por inmunohistoquímica de TSP1 en tejido tumoral respecto a tejidos sanos. La expresión de TSP1 fue menor en tejido tumoral pero no se asoció a diferencias significativas en la supervivencia, sin embargo el estudio de Yamaguchi et al<sup>188</sup>, que también medía la expresión de TSP1 en tejido tumoral de pacientes con CPNM, mostraba diferencias significativas, con una supervivencia a los 5 años del 77% cuando la expresión de TSP1 era fuerte y del 55,1% cuando la expresión era débil ( $p = 0,0046$ ).

El FT, que es el receptor del Factor VII de coagulación en condiciones fisiológicas, se expresa constitutivamente en las células extravasculares y desempeña un papel central en la hemostasia iniciando la coagulación tras la lesión vascular<sup>189</sup>. También, está presente en el plasma y parece desempeñar un papel importante en el crecimiento tumoral y la diseminación a distancia<sup>190</sup>. Entre los mecanismos de patogénesis se incluye la generación de trombina, con la consiguiente formación de fibrina y la activación plaquetaria, permitiendo una vía de escape a las células tumorales circulantes de la vigilancia inmunológica, lo que favorece la proliferación celular, la migración, y la angiogénesis tumoral.<sup>191</sup> Es conocido que las micropartículas expresan FT<sup>192</sup> que, por otra parte existe elevación de los niveles de las mismas en pacientes con cáncer<sup>193</sup>. Por lo tanto, puede contribuir a la trombosis. A su vez, las plaquetas también contribuyen al estado protrombótico<sup>194-5</sup>.

La Interleukina 6 (IL6) es una citokina inflamatoria multifuncional que en condiciones fisiológicas regula la supervivencia de la célula y la apoptosis. La IL6 se une a su receptor activando tres grandes cascadas de señalización: la vía MEK/extracelular signal-related kinase (Erk), la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) y la vía Janus quinasa (Jak) 2<sup>196</sup>. La IL6 se produce ante una variedad de estímulos y su producción es autoregulada en distintos tipos celulares<sup>197-8</sup>. En condiciones patológicas, actúa favoreciendo el crecimiento del tumor, la angiogénesis tumoral y la diseminación a distancia<sup>199-200</sup>, además interviene en el mecanismo de resistencia al

tratamiento<sup>201</sup>. De Vita et al<sup>202</sup>, estudiaron sus niveles en pacientes con CPNM y encontraron una relación entre los niveles elevados y un peor pronóstico.

No existe un estudio que relacione a las CECs, EPCs y MPs con los niveles de VEGF, TSP1, FT, IL6 y la generación endógena de trombina en pacientes con CPNM tratados con quimioterapia asociado a bevacizumab. Este estudio pretende responder a la pregunta de cuál es el valor pronóstico y predictivo de las variables CECs, EPCs y MPs así como los marcadores de angiogénesis, coagulación e inflamación citados, en pacientes con CPNM avanzado y estudiar la correlación entre las mismas.



## **2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2.1. Hipótesis**

No existe un estudio que relacione a las CECs, EPCs y MPs con los niveles de VEGF, TSP1, FT, IL6 y la generación endógena de trombina en pacientes con CPNM tratados con quimioterapia asociado a bevacizumab. Este estudio pretende responder a la pregunta de cuál es el valor pronóstico y predictivo de las variables CECs, EPCs y MPs así como los marcadores de angiogénesis, coagulación e inflamación citados, en pacientes con CPNM avanzado y estudiar la correlación entre las mismas.

## **2.2. Objetivo principal**

Valorar si los niveles de CECs, CPECs y MPs en sangre periférica de pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico, antes del inicio del tratamiento, tienen valor pronóstico, y si sus niveles tras la administración de quimioterapia (con y sin bevacizumab), se correlacionan con la respuesta tumoral y la aparición de eventos trombóticos.

## **2.3. Objetivos secundarios**

Valorar si los niveles de marcadores de angiogénesis (VEGF, sVEGFR1, VGFR2 y TSP1), de coagulación (FT)y de inflamación ( IL6) se correlacionan con los niveles de CPECs, CECs y MPs y si tienen valor pronóstico en pacientes con CPNM, antes y después del inicio del tratamiento.

Valorar la influencia del bevacizumab sobre la variación de los niveles de las variables.



**3-PACIENTES**

### **3.1. Criterios de inclusión**

Se incluyeron 60 pacientes del servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, que acudieron a valoración tras el diagnóstico de CPNM avanzado. En las tablas 2.1 y 2.2 se describen respectivamente, los criterios de inclusión y exclusión.

**Tabla 3.1.** Criterios de inclusión de los pacientes con CPNM en el estudio.

- Diagnóstico histológico confirmado de CPNM
- Estadios III A inoperables, IIIB y IV
- No haber recibido quimioterapia previa,
- Edad  $> 18$  y  $\leq 80$  años
- Estado general basado en la escala de la ECOG  $< 3$
- Leucocitos  $> 4000 / \text{mm}^3$
- Plaquetas  $> 100.000 / \text{mm}^3$
- Creatinina sérica  $< 1.2$
- Bilirrubina  $\leq 1,5$  valores normales (VN)
- GOT/GPT  $\leq 3$  VN
- Haber aceptado participar y haber firmado el consentimiento informado

**Tabla 3.2.** Criterios de exclusión de los pacientes con CPNM en el estudio.

- Diagnóstico histológico no confirmado de CPNM
- Estadio I, II y III A operables
- Haber recibido quimioterapia previa,
- Edad < 18 y > 80 años
- Estado general basado en la escala de la ECOG >3
- Leucocitos < 4000 / mm<sup>3</sup>
- Plaquetas < 100.000 / mm<sup>3</sup>
- Creatinina sérica > 1.2
- Bilirrubina > 1,5 valores normales (VN)
- GOT/GPT > 3 VN
- Haber rechazado participar o revocado la firma del consentimiento informado

## **4-MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.1. Diseño del estudio**

Estudio prospectivo de pacientes consecutivos diagnosticados de CPNM, tratados, según protocolo asistencial del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, con quimioterapia de primera línea basada en dobletes de platino con o sin radioterapia, o con quimioterapia más bevacizumab.

#### 4.2. Variables clínicas

*Pacientes.* Se incluyeron 60 pacientes, y se registraron los siguientes datos de la historia clínica: sexo, edad, peso, talla, diagnóstico histológico y estadio clínico. Antecedentes patológicos y comorbilidad. El estudio de extensión se realizó mediante TAC de tórax y abdomen y PET corporal. Se realizó un control analítico basal que incluía hemograma y hemostasia, además de bioquímica básica de función renal, perfil hepático y metabólico.

*Tratamiento.* Los pacientes fueron tratados según el protocolo asistencial del Servicio de Oncología Médica. Los pacientes con estadio IIIA inoperables y IIIB recibieron tratamiento según se detalla en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Esquemas de tratamientos administrados a los pacientes con CPNM y con enfermedad localmente avanzada

---

Cisplatino 75 mg/m<sup>2</sup> + Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días por 6 ciclos

Carboplatino AUC 6 + Paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días por 6 ciclos

Cisplatino 75 mg/m<sup>2</sup> + Pemetrexed 500 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días por 6 ciclos

---

La dosis de cisplatino, docetaxel, paclitaxel y pemetrexed se calculó en mg/ m<sup>2</sup> de superficie corporal del paciente.

AUC 6: área bajo la curva 6

Pemetrexed sólo se administró en pacientes con histología no epidermoide.

Los pacientes con estadio III + derrame pleural y con estadio IV con histología no epidermoide sin contraindicaciones para bevacizumab recibieron quimioterapia asociada a bevacizumab a dosis de 7,5 mg / kg cada 21 días.

*Tratamiento de soporte:* Pauta antiemética previo a la quimioterapia.

Dexametasona 20 mg IV, granisetron 1 mg IV y aprepitant 120 mg VO.

Días 2 y 3 tras el tratamiento:-Aprepitant 80 mg /día VO.

*Valoración de respuesta al tratamiento:* Veintiún días después del tercer ciclo de quimioterapia se realizó la valoración clínica basada en TAC según criterios RECIST (Response evaluation criteria for solid tumors<sup>203</sup>) y la segunda extracción sanguínea para la medición de los marcadores.

*Seguimiento tras el tratamiento:* al finalizar el tratamiento, el paciente fue valorado cada tres meses, en el Servicio de Oncología Médica.

#### *Grupo control*

El grupo control estuvo formado por 60 pacientes sanos sin ningún tipo de alteración conocida, con edad y distribución de sexo semejante a la de los pacientes.

### **4.3. Variables de laboratorio**

#### **4.3.1. Extracción y Procesamiento de las muestras**

Extracción de la sangre.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena cubital, de forma no traumática, y recogida en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson NJ, USA) siliconados con diferentes anticoagulantes EDTA K3 (4,3 mg), citrato sódico 0,109 M, en función de la técnica a la que estaban destinados.

Procesamiento de las muestras de sangre

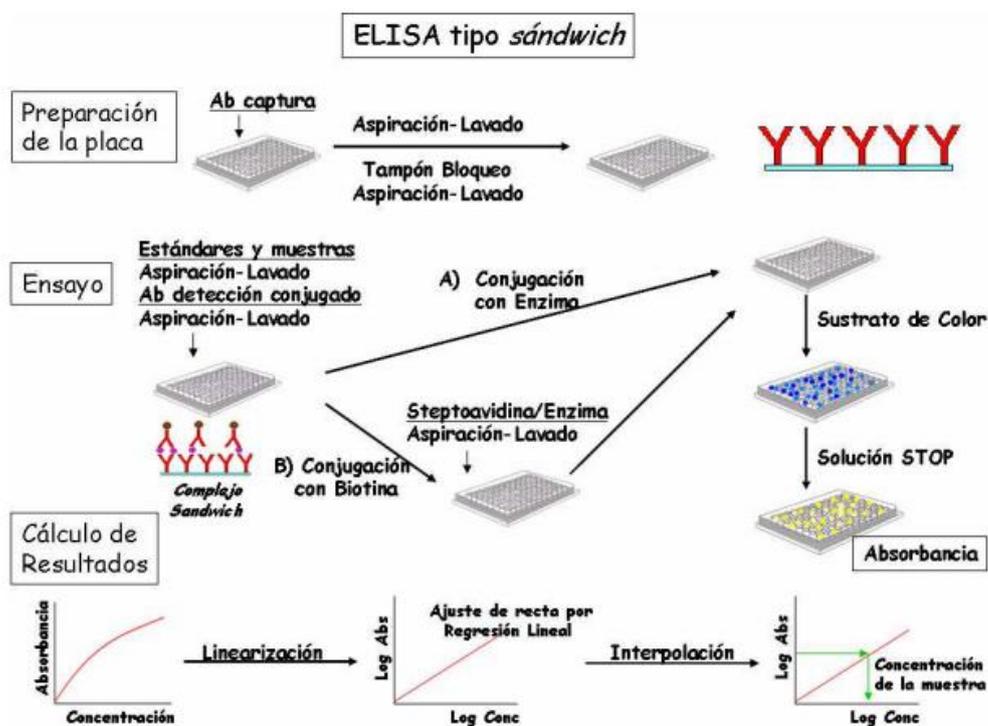
Las muestras de sangre se mantuvieron a 4°C tras su extracción hasta el inicio de su procesamiento. La sangre completa se utilizó para la cuantificación de las EPCs y CECs, para las demás técnicas inmunológicas se realizó la separación del plasma y del suero mediante centrifugación a 1500g durante 15 minutos realizando posteriormente alícuotas para su utilización o congelación a -80 °C.

#### **4.3.2 Técnicas para la determinación de proteínas relacionadas con la angiogénesis, coagulación e inflamación**

##### **4.3.2.1. Técnicas inmunológicas**

*Elisa tipo sándwich.* Es el tipo de Elisa más utilizado ya que tiene mayor sensibilidad que los ensayos en los que el antígeno se une directamente a los anticuerpos inmovilizados en la fase sólida.

En este tipo de ensayo los pocillos de las microplacas están recubiertos de un anticuerpo específico de captura en exceso, quedando así retenido el antígeno que deseamos cuantificar tras una incubación. Cualquier sitio libre quedará bloqueado por una proteína que no interfiera en la cuantificación, tal como la albúmina. Tras un lavado se adiciona un segundo anticuerpo específico en exceso, que generalmente difiere un poco del primer anticuerpo. Este anticuerpo puede estar conjugado con biotina o con una enzima. Se realiza un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido al antígeno y se añade un sustrato adecuado a la enzima utilizada. Tras la incubación se mide el grado de hidrólisis del sustrato. La cantidad de sustrato hidrolizado será proporcional a la cantidad de enzima unida al pocillo, la cual será proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra.



**Figura 4.1** Esquema ELISA tipo sándwich.

*Determinación de los niveles de VEGF:* Los niveles del VEGF circulante se determinaron mediante un ELISA tipo sándwich comercial (VEGF ELISA kit, IBL International GmbH, Hamburgo, Alemania). A las placas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano se añadió 50µL/pocillo de las muestras de suero dejando incubar 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar la placa 4 veces con tampón de lavado se añadió 100µL/pocillo de anticuerpo secundario anti-VEGF (conjugado de biotina) dejando incubar durante 1 hora. Tras 4 lavados se adicionó 100µL/pocillo de Streptoavidina-Peroxidasa dejando incubar durante 30 minutos. El exceso de Streptoavidina-Peroxidasa se eliminó mediante 4 lavados y se añadió 100µL/pocillo de sustrato de peroxidasa dejando incubar durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 100µL/pocillo de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N). Tras 15 minutos de estabilización la placa se leyó a una longitud de onda de 450nm en un lector de ELISAMRX<sup>TC</sup> Revelation (Thermo LabSystems).

*Determinación de los niveles de sVEGFR1:* Los niveles de VEGFR1 circulante se determinaron mediante un ELISA tipo sándwich comercial (Quantikine® Human sVEGF R1 /Flt-1, R&D Systems, MN, EE.UU). A las placas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-VEGF R1 se les añadió 100µL/pocillo de las muestras de suero y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal orbital a 500 rpm. Tras realizar 4 lavados con tampón de lavado se adicionó 200µL/pocillo del anticuerpo policlonal secundario anti-VEGFR1 conjugado con peroxidasa, dejándolo 2 horas incubando en un agitador horizontal orbital a 500 rpm a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados y se añadió 200µL/pocillo de sustrato de peroxidasa, tras la cual se realizó una incubación de 30 minutos en oscuridad. Transcurrida la incubación se añadió 50µL/pocillo de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N). Se dejó estabilizar durante 15 minutos y se procedió a la lectura una longitud de onda de 450 nm con corrección de 540 nm en un lector de ELISAMRX<sup>TC</sup> Revelation (Thermo LabSystems).

*Determinación de los niveles de VEGFR2:* Los niveles de VEGFR2 circulante se determinaron mediante un ELISA tipo sándwich comercial (Quantikine® Human sVEGF R2/KDR/Flk-1 R&D Systems, MN, EE.UU). A las placas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-VEGFR2 se les añadió 100µL/pocillo de las muestras de suero incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Se procedió al lavado de los

pocillos con tampón de lavado 4 veces. Se añadió 200µL/pocillo de anticuerpo secundario anti-VEGFR2 conjugado con peroxidasa y se procedió a su incubación durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante 4 lavados se adicionó 200µL/pocillo de solución sustrato y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Se añadió 50µL/pocillo de Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) tras 15 minutos de estabilización se realizó la lectura a 450 nm con corrección de longitud de onda a 540nm en un lector ELISAMRX<sup>TC</sup> Revelation (Thermo Labsystems).

*Determinación de los niveles de IL6:* La determinación de IL6 circulante se determinó mediante un ELISA tipo sándwich comercial (Human IL6 High Sensitivity ELISA, Diaclone, Bensacon Cedex, Francia). A las placas recubiertas con anticuerpo monoclonal Anti IL6 se les añadió 100µ/pocillo de las muestras de suero y se les adicionó 50µL/pocillo de anticuerpo secundario Anti-IL6 conjugado con Biotina, se dejó incubar durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se realizó 3 lavados con tampón de lavado. Se adicionó 100µL/pocillo de la solución de Streptoavidina y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó 3 lavados y se añadió 100µL/pocillo de Solución TMB Sustrato dejando incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Para detener la reacción de color fueron adicionados 100µL/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tras 15 minutos de estabilización se realizó la lectura a 450nm en un lector ELISAMRX<sup>TC</sup> Revelation (Thermo Labsystems).

*Determinación de los niveles de FT:* Los niveles de FT circulante se determinaron mediante un ELISA tipo sándwich comercial (American Diagnostica, CT, EE.UU). A las placas recubiertas con anticuerpo monoclonal Anti-TF se les añadió 100µL/pocillo de las muestras de plasma obtenidas a partir de sangre total anticoagulada con citrato sódico diluidas a ¼ y se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C en nevera. A la mañana siguiente se procedió a realizar 4 lavados con tampón de lavado. Se añadió 100µL/pocillo del anticuerpo secundario Anti-TF conjugado con biotina y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación se realizaron 4 lavados y se añadió 100µL/pocillo del conjugado Streptoavidina-peroxidasa realizando otra incubación de 1 hora. Se procedió al lavado 4 veces y se adicionó 100µL/pocillo de solución sustrato incubando durante 20

minutos a temperatura ambiente y oscuridad. La reacción de color se detuvo añadiendo 50µL/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M. Tras 15 minutos de estabilización se realizó la lectura a 450nm en un lector ELISAMRX<sup>TC</sup> Revelation (Thermo LabSystems).

*Determinación de los niveles de TSP1:* La cuantificación de los niveles de TSP1 se realizó mediante un ELISA tipo sándwich comercial (MaxiSorp surface; Nunc, Dinamarca). La placa fue recubierta con TSP1 (20µg/ml) obtenida a partir de plaquetas humanas y fueron incubadas durante toda la noche. Las muestras y el standard de TSP1 (Sigma-Aldrich) fueron incubados durante toda la noche con un anticuerpo policlonal específico para la TSP1 (thrombospondin Ab-8; Neomarkers Lab Vision, USA) posteriormente fueron adicionados a la placa ELISA e incubados durante 2 horas. Tras la incubación se adicionó el anticuerpo secundario (inmunoglobulina G anti-conejo de Amersham Biosciencias, Inglaterra) conjugada con peroxidasa de rábano y se incubó durante 2 horas. Se adicionó una solución sustrato de o-dihidroclorofenilendiamina (OPD; Sigma-Aldrich), la reacción se detuvo con una solución 4N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tras 15 minutos de estabilización se realizó la lectura a 450nm en un lector ELISAMRX<sup>TC</sup> Revelation (Thermo LabSystems).

#### **4.3.2.2. Técnicas de coagulación.**

*Cuantificación de la Generación Endógena de Trombina (GET):* Las muestras destinadas para la cuantificación de la generación de Trombina fueron recogidas con anticoagulante citrato trisódico 0.109 M, en tubos de plástico Vacutainer (BD Diagnostics) descartando los primeros 3ml. Posteriormente se centrifugaron a 1.500g, durante 30 minutos, a 4°C para la obtención del plasma con MPs y libre de plaquetas (PLP). Se realizaron alícuotas de PLP y fueron congeladas a -80°C para su posterior análisis.

El ensayo de GET se realiza para evaluar la capacidad de generación de trombina de las MPs contenidas en el PLP. La GT se mide por el método de trombograma calibrado automatizado (CAT, Thrombinoscope BV), en las diferentes muestras de plasma. La generación endógena de trombina se activa por la adición de 20µL Cl<sub>2</sub>Ca (12,5mM), 20µL de sustrato de trombina fluorogénica (Thrombinoscope BV) y 20µL de calibrador a 80µL de plasma. La trombina generada se mide en un lector

de fluorescencia (Fluoroskan Ascent, Thermo Labsystems) a 390/460 nm. Se obtienen curvas de generación de trombina que se calculan con el software de Thrombinoscope (Thrombinoscope BV) de las que se analizan tres parámetros: tiempo de latencia (min) (fase de iniciación de coagulación), potencial endógeno trombina (nM x min.) y pico de trombina (nM).

#### **4.3.2.3. Técnica inmunomagnética**

*Cuantificación de CECs:* Para la cuantificación de las CECs se siguió el protocolo standard de Woywodt A et al<sup>138</sup>. Se trata de un aislamiento inmunomagnético seguido de una confirmación mediante el marcado con Ulex-Europaeus-Lectin-1/FITC.

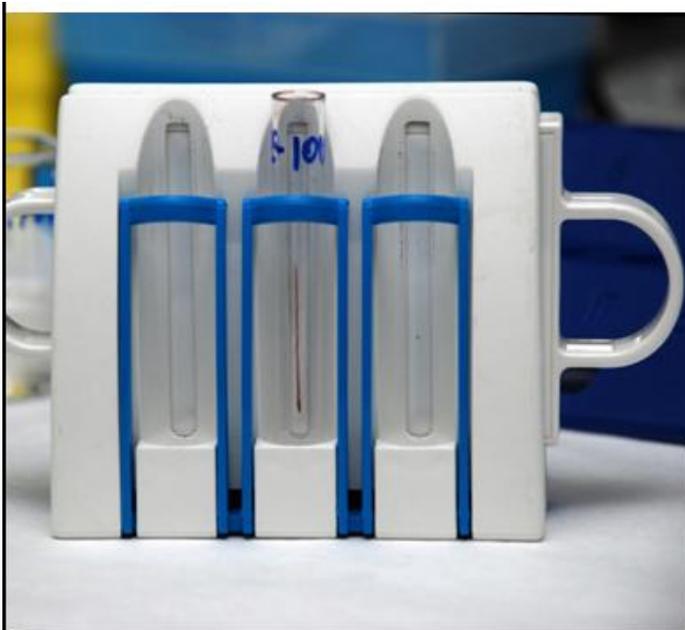
La sangre utilizada para la técnica se obtuvo por venipuntura descartando el primer tubo, evitando de este modo la contaminación por el traumatismo inicial de la pared vascular. Previo a la técnica se prepararon las inmunoesferas. Estas se incubaron con el anticuerpo a utilizar durante una hora obteniendo así una suspensión de inmunoesferas recubiertas de anticuerpo Anti-CD146.

Para la cuantificación CECS se utilizó 1ml de sangre periférica, esta se adiciono en un tubo de poliestireno junto a 1ml de PBS. Se adicionó 20µL de agente de bloqueo FcR y 50µL de microesferas inmunomagnéticas ligadas a anti-CD146. Se procedió a una incubación en un agitador orbital durante 30 minutos en nevera a 4°C. Tras la incubación se procedió a realizar el lavado de la muestra, para ello se utilizó el imán Magnaet MPC-L Dynal, insertando el tubo con la muestra dentro del imán quedando las células de interés retenidas por la acción del campo magnético. Con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró la fase líquida añadiendo seguidamente 2 ml de PBS para realizar el lavado. Este proceso se repitió 4 veces. Tras la fase de lavado se procedió a incubar la muestra con 100 µL de una solución FITC/UEA-1 (2 mg/ml) durante 1 hora en agitación horizontal y oscuridad. Seguidamente se realizó un nuevo lavado. Se insertó la muestra en el imán quedando retenidas las células de interés ya marcadas con la solución FITC, descartando la fase líquida y adicionando 2 ml de PBS para realizar el lavado. Esta acción se realizó dos veces. Tras el lavado, la muestra se

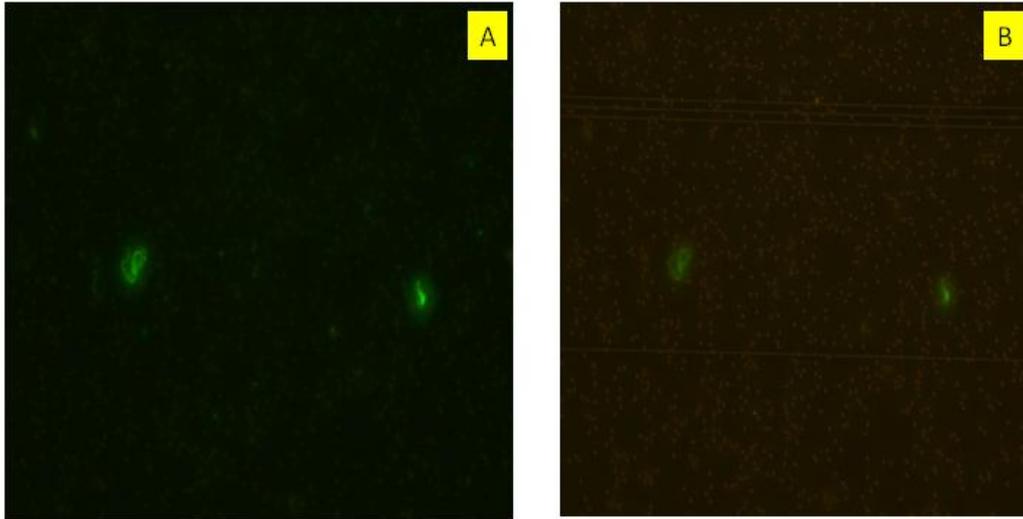
resuspendió en 200  $\mu$ L de PBS y se cargó en una cámara Nageotte para la realización del recuento mediante microscopia de fluorescencia.

El criterio utilizado para identificar las células endoteliales circulantes fue: la inclusión de 5 o más microesferas en el seno de la célula, siendo esta de un tamaño aproximado a 20  $\mu$ m o mayor y la expresión de fluorescencia en el microscopio ultravioleta. El número de células contadas en la cámara Nageotte, se multiplicó por cuatro. Este número corresponde al factor de dilución de la muestra.

En las Figuras 4.2 y 4.3 se observan las imágenes del imán y de cómo se observan las células endoteliales al microscopio de fluorescencia.



**Figura 4.2.** Foto del Imán Magnaet Dynal MPC



**Figura 4.3 A y B:** *Imagen al microscopio de fluorescencia de 2 células endoteliales y las microsferas fijadas a las mismas.*

#### **4.3.2.4. Técnicas de citometría de flujo.**

*Cuantificación de MPs:* Las MPs totales del plasma se analizaron por citometría de flujo mediante la detección de la fosfatidilserina presente en sus membranas. Las muestras de plasma (10 $\mu$ l) se diluyeron en tampón HEPES- CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM (pH 7,4) (500  $\mu$ L) y se incubaron durante 60 min a 4°C en la oscuridad con Annexin V-FITC (4  $\mu$ L) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA). La adquisición de eventos se cuantificó en un citómetro EPICS XL-LCM (Beckman Coulter). La lectura de los canales de dispersión de la luz FSC y SSC y de fluorescencia se realizó en escala logarítmica. Para establecer la elección de la ventana de detección de las MPs de diámetro entre 0,5 a 1  $\mu$ m, se utilizaron microesferas fluorescentes (0.5–3.0  $\mu$ m, Megamix, BioCytex). Las MPs se definieron como partículas de diámetro entre 0,5-1  $\mu$ m y teñidas positivamente para FITC-Annexin V. Para limitar el ruido de fondo todos los tampones utilizados como diluyentes se purificaron con filtros 0,22  $\mu$ m (Millipore). Los eventos se adquirieron durante 120 s a flujo alto. Los resultados de las muestras del PLP y PLMP se expresaron en nº de eventos/ $\mu$ L y representan el número de MPs totales contenidas en cada tipo de muestras.

*Cuantificación de EPCs:* Para esta cuantificación se utilizó un kit de enriquecimiento inmunomagnético comercial (EPC Enrichment and Enumeration Kit, Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach, Alemania).

El método de cuantificación de Miltenyi Biotec se basa en un enriquecimiento de la muestra de sangre previo a su análisis citométrico. Para ello se utilizan microesferas inmunomagnéticas que quedan ligadas a los Antígenos de superficie CD34 y CD133. Tras esta unión, la muestra es sometida a la fuerza de un campo magnético (imán) quedando retenidas en el interior de la misma.

La sangre total anticoagulada con EDTA K<sub>3</sub>, 21 ml, fue distribuida en tres tubos diferentes: 200  $\mu$ L en un tubo de 1,5 ml que nombramos Muestra Control CD133, 10ml en un tubo Falcón de 50ml que nombramos Muestra Control CD309, y 10ml en un tubo Falcon de 50ml que nombramos Muestra EPCs; la muestra restante se empleó para el recuento de leucocitos en un lector Coulter.

Tras la lisis de los hematíes y una centrifugación a 300 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante resuspendiendo el pellet en PBS. Tras la resuspensión se adicionó 100µL de agente de bloqueo FcR y 100 µL de mezcla de enriquecimiento para EPC a los dos tubos de 50 ml y se dejó incubar a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente se añadieron los marcadores para su enriquecimiento e identificación tal y como se recoge en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Marcadores añadidos a las muestras para su enriquecimiento e identificación:

	Mezclas	FITC	PE	PE-Cy5	APC
MC CD133	10µL de mezcla control CD133	Anti-CD34	IgG2b de ratón como Isotipo	Anti-CD14	
MC CD309	50µL de mezcla control CD309	Anti-CD34	Anti-CD133	Anti-CD14	IgG1 ratón
M EPCs	50µL de mezcla enriquecimiento EPC	Anti-CD34	Anti-CD133	Anti-CD14	Anti-CD309

MC CD133: muestra control CD133; MC CD 309: muestra control 309; M EPC: muestra EPC; FITC: fluoresceína isocianato; PE: ficoeritrina; PE-Cy5 Indodicarbocyanine-5 APC alofococianina

Tras esta adición se realizó una nueva incubación a 4°C durante 10 minutos, seguido de centrifugación durante 10 minutos a 300 g, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en PBS. El pellet resuspendido se purificó mediante las columnas de separación magnética MACS MS Columns, y tras su retención en la columna, estas se eluyeron con 1 ml de Tampón PBS obteniendo la muestras listas para su análisis citométrico.

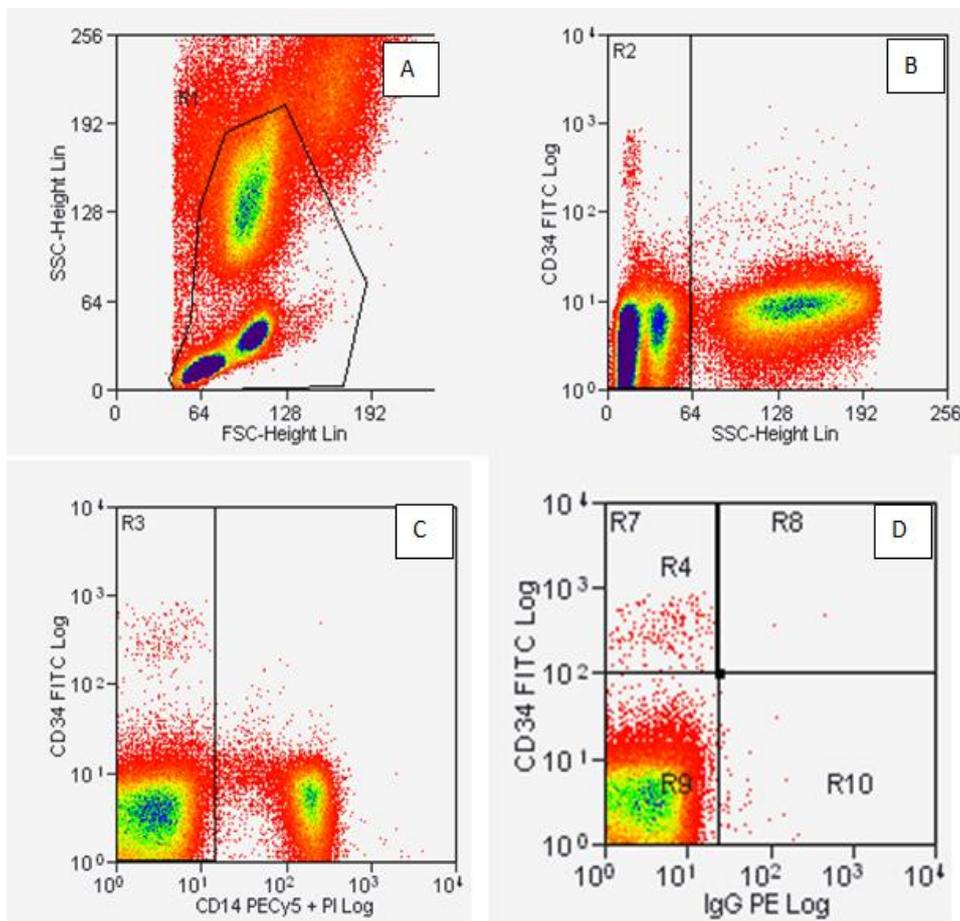
#### Técnica Citométrica

La adquisición de las muestras fue realizada con un citómetro BD FACSCALIBUR (Becton Dickinson, NJ, EE.UU).

En la Muestra Control CD133 se realizó la cuantificación de células CD34+ totales y se realizó un control Isotipo CD133 que nos permitió definir la positividad de las células CD133.

En la Muestra Control CD309 se realizó un Control Isotipo CD309 para definir la positividad de las células CD309 permitiéndonos calcular los eventos positivos de unión inespecífica (ruido de fondo) que fueron restados a la cuantificación en la muestra de EPCs. La Muestra EPCs es la que utilizamos para su cuantificación.

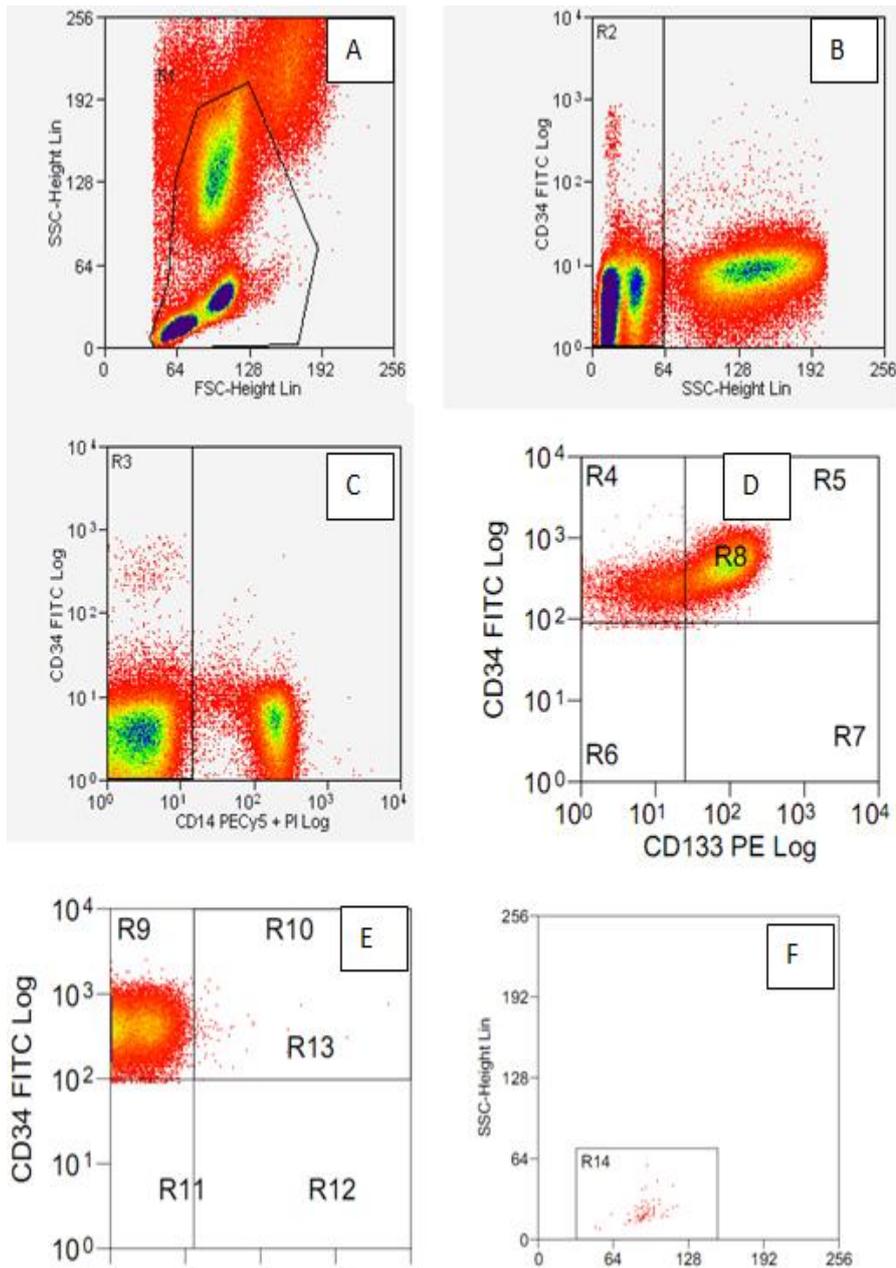
El primer paso fue crear un diagrama de puntos, para la adquisición de la Muestra Control CD133, creando los diagramas de puntos FSC/SSC, SSC/CD34, CD34/CD14<sup>+</sup>PI, ratón CD34/IgG según se observa en la Figura 4.4.



**Figura 4.4.** Adquisición de la Muestra Control CD133, creando los diagramas de puntos FSC/SSC, SSC/CD34, CD34/CD14<sup>+</sup>PI, ratón CD34/IgG .A: En el primer diagrama de puntos realizamos la Región R1 donde seleccionamos todos los leucocitos, descartando el debris y las células en proceso apoptótico. B: En el segundo diagrama de puntos solamente analizamos los eventos seleccionados en R1 y enfrentamos SSC frente a

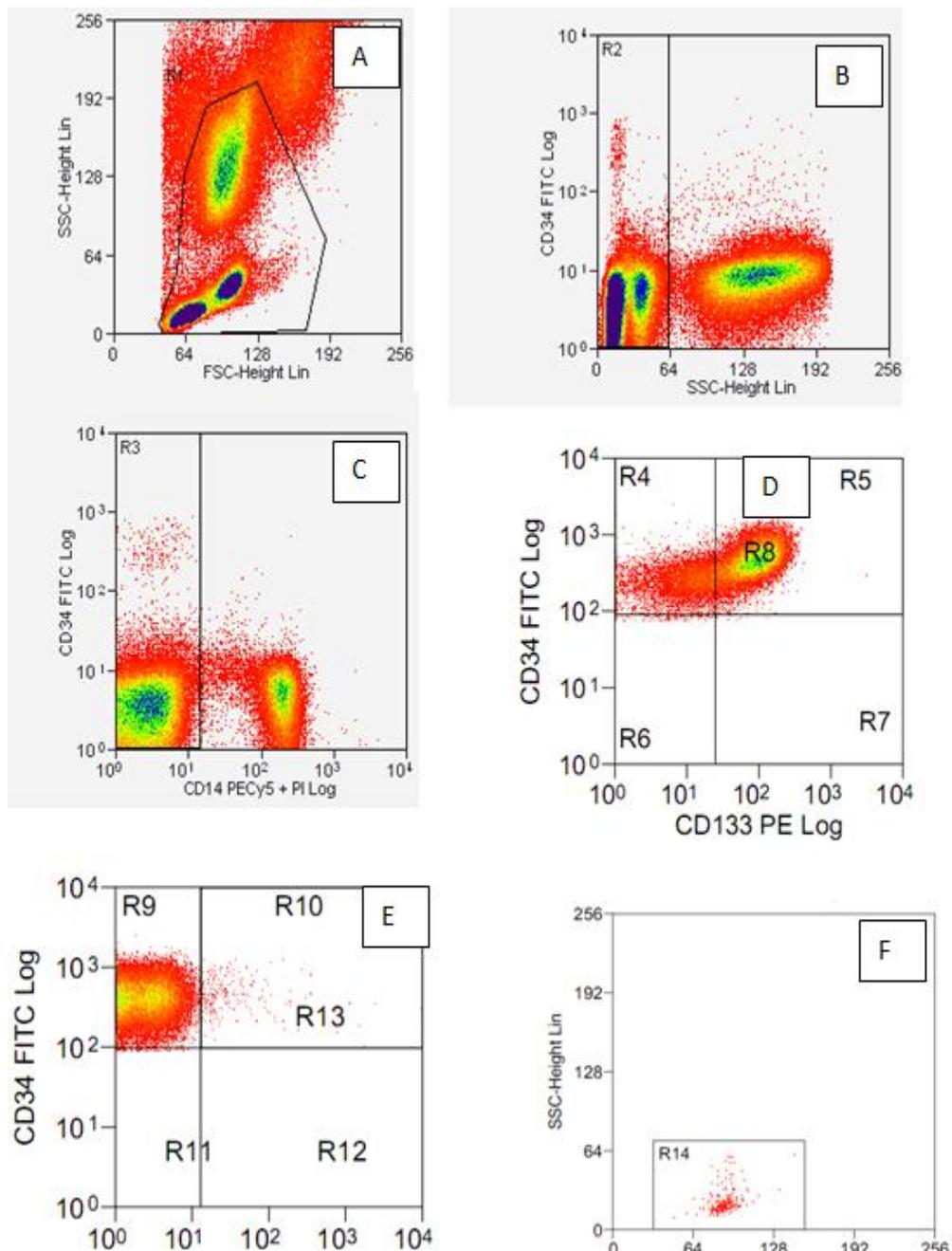
CD34<sup>+</sup>, creamos una región R2 donde seleccionamos todos los eventos CD34<sup>+</sup> con un valor bajo para SSC. **C:** En el tercer diagrama de puntos analizamos la región R3, enfrentando CD34 frente a CD14<sup>+</sup>, creándose una Región R3 seleccionando los eventos CD34<sup>+</sup>, quedando excluidos así los eventos CD14<sup>+</sup> (marcador específico de monocitos) como las células muertas o en proceso apoptótico, ya que estas embeben en su ADN el yoduro de propidio expresando una mayor concentración de fluorescencia en el eje X. **D:** En el cuarto diagrama de puntos enfrentamos CD34<sup>+</sup> frente a un control isotipo de ratón IgG y creamos una región R4, los eventos cuantificados en esta región fueron los que se utilizaron para realizar el recuento de CD34<sup>+</sup> totales mediante una fórmula que se explica más adelante. También se realizaron cuadrantes con la finalidad de determinar las uniones inespecíficas con el isotipo de ratón y el punto de intersección entre la positividad y la negatividad para este marcador.

Para la adquisición de la muestra control CD309, realizamos los siguientes diagramas de puntos: FSC/SSC, SSC/CD34, CD34/CD14+PI, CD34/CD133, ratón CD34/IgG según se observa en la Figura 4.5. En este paso utilizamos la plantilla de adquisición realizada en la muestra control CD133, donde se realizó la determinación de las positivities de las células así como el control isotipo CD133. Se cambió el control isotipo de ratón CD133 por el anticuerpo Anti CD133/PE obteniendo el número de eventos positivos para CD34 y CD133 (Región 8), R8 se analizó en un nuevo diagrama enfrentando CD34 ante un isotipo de ratón CD309 (este control isotipo nos permitió descartar las uniones inespecíficas CD309 positivas. Tras el análisis de este diagrama, los eventos situados en R13 se analizaron en un nuevo diagrama FSC/SSC, y estas células situadas en la región R14 serán restadas al total de células endoteliales obtenidas en la muestra EPCs.



**Figura 4.5.A-F:** Adquisición de la muestra control CD309.

Por último, la muestra EPCs se adquirió con la misma plantilla utilizada para la muestra CD309 donde teníamos todas las positividades y uniones inespecíficas definidas, donde la única variación ante la muestra CD309 fue la sustitución del control isotipo CD309 por el marcador Anti CD309 pertinente (Figura 4.6).



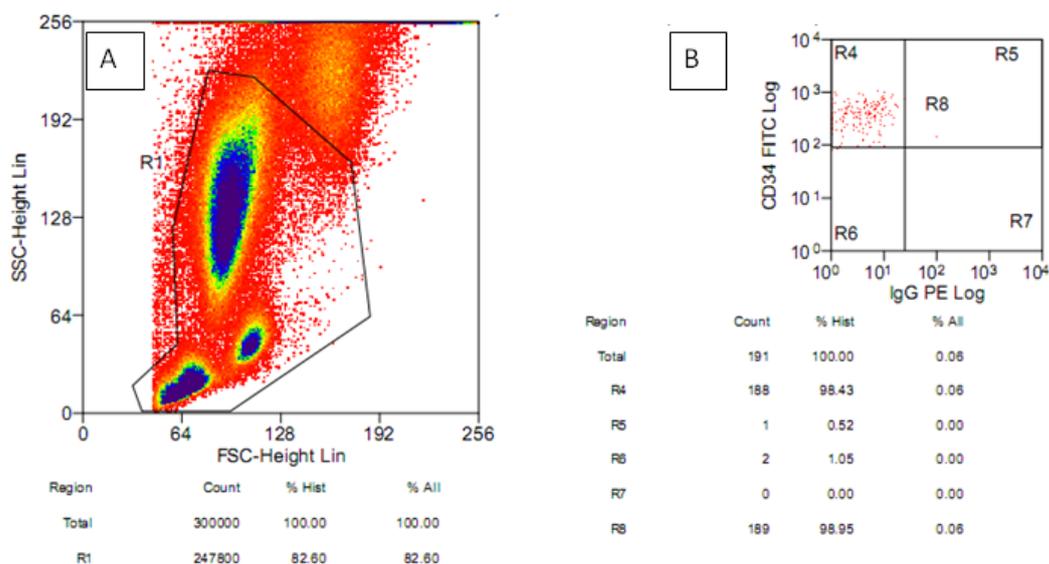
**Figura 4.6. A-F: Adquisición de muestra EPCs.** En el diagrama de puntos CD34/CD133 obtuvimos el total de células CD34<sup>+</sup> y CD34/CD133 que llamamos R8 (**D**), esta región se analizó en un diagrama CD34/CD309 Donde se realizó una región R13 (**E**) recogiendo los eventos positivos para R13, R13 se analizó en un nuevo diagrama FSC/SSC en el cual se confirmó mediante tamaño y complejidad que los eventos situados en R14 se trataban de EPCs (**F**).

Tratamiento de los datos y formulas utilizadas.

El análisis y cuantificación del número absoluto de las células CD 34<sup>+</sup> viables se realizó mediante la fórmula que se observa en las Figuras 4.7 y 4.8.

$$\text{Absolute number of CD34}^+ \text{ cells in 10 mL cell sample} = \frac{\% \text{ viable CD34}^+ \text{ cells} \times \text{Absolute number of leukocytes in 10 mL cell sample}}{100}$$

**Figura 4.7.** Fórmula utilizada para la cuantificación del número absoluto de células CD34<sup>+</sup>.



**Figura 4.8 A y B:** Cuantificación de Número absoluto de células CD34 positivas viables. Donde el % viable CD34+ procede de la muestra control CD133, R1 (eventos viables) R4 (eventos CD34+): % viable CD34 cells = (R4/R1)\*100

El número absoluto de leucocitos en 10 ml de muestra se obtuvo mediante un recuento en un autoanalizador coulter Beckman - ACT diff, y el número absoluto de EPCs, se obtuvo mediante los siguientes pasos según se ven en las Figuras 4,9-11.

$$\text{Absolute number of EPCs in 10 mL cell sample} = \frac{\left( \frac{\% \text{ gated EPC sample}}{\% \text{ gated control sample CD309}} \right) \times \text{Absolute number of CD34}^+ \text{ cells}}{100}$$

Figura 4.9. Cálculo del Número absoluto de EPCs en 10 ml de sangre.

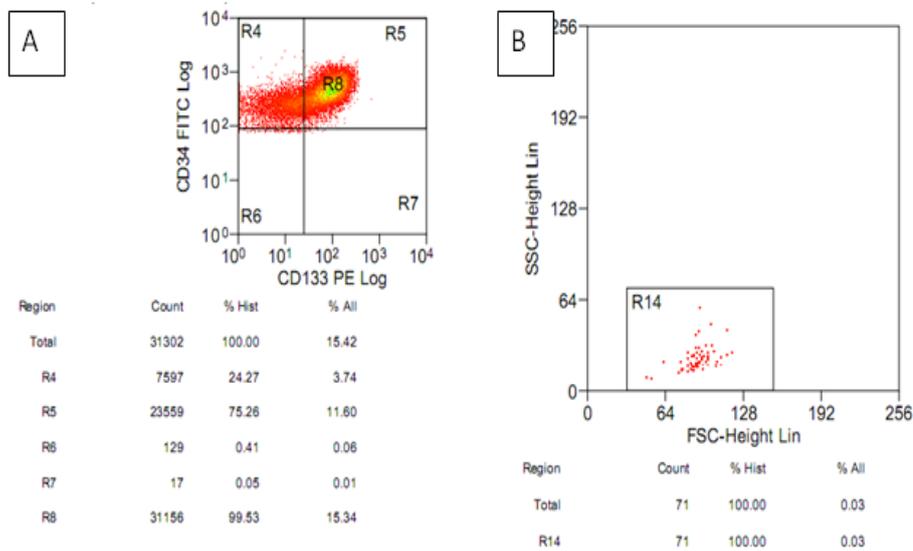
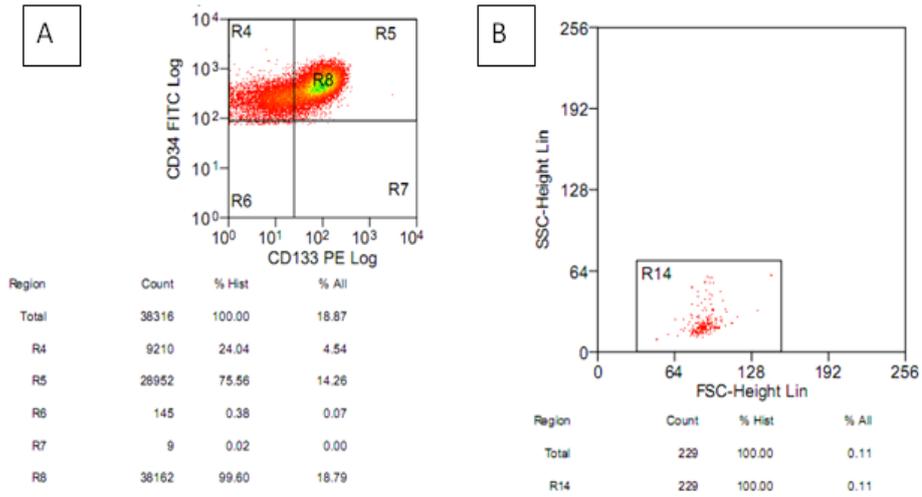


Figura 4.10. A y B: Porcentaje de muestra control CD309. Donde R14 contiene células CD34+/CD133+/ratón IgG +/bajo FSC/bajo SSC y R8 contiene células CD34+.  
 % ventana control CD309 = (R14/R8)\*100



**Figura 4.11 A y B:** Porcentaje de la Muestra EPCs . Donde R14 contiene células CD34+/CD133+/CD309+/bajo FSC/bajo SSC y R8 contiene células CD34+.  
**% región muestra EPC = (R14/R8)\*100**

#### 4.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa SPSS versión 15.0. Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

##### Cálculo del tamaño muestral

El tamaño de muestra necesario se ha estimado mediante la prueba de contraste estadístico de hipótesis. Se ha establecido una seguridad del estudio (riesgo de cometer un error  $\alpha$ ) del 5%, un poder estadístico  $1-\beta$  (riesgo de cometer un error  $\beta$ ) del 20%, considerando la hipótesis bilateral y conocida la varianza de la variable a determinar. Previendo una pérdida de pacientes de hasta 10%, el tamaño muestral ajustado a las pérdidas se ha calculado mediante la expresión: muestra ajustada a las pérdidas =  $n / (1-R)$ , donde  $n$  es el número de sujetos sin pérdidas y  $R$  es la proporción esperada de pérdidas. De forma que el número de pacientes, requerido en cada grupo del estudio, fue de 50.

##### Bondad del ajuste con una distribución normal

Prueba “Kolmogórov-Smirnov” se ha aplicado para determinar si las variables cualitativas estudiadas se ajustan a una distribución normal.

##### Estudio de contraste estadístico

Prueba “t de Student” se ha aplicado para efectuar el estudio de contraste estadístico entre dos grupos de variables cuantitativas, con distribución normal.

Prueba “Análisis de la varianza” (ANOVA) se ha aplicado para efectuar el estudio de contraste estadístico entre tres o más grupos de variables cuantitativas, con distribución normal, aplicando el ajuste de Bonferroni, para establecer el valor de la significación (valor de P) de las comparaciones múltiples.

Prueba “t de Student para datos pareados” se ha aplicado para efectuar el estudio de contraste estadístico entre dos grupos pareados de variables cuantitativas.

##### Asociación lineal de variables cuantitativas

Procedimiento de “Correlaciones” se ha aplicado para determinar el grado de relación entre dos variables continuas se ha aplicados la prueba de “correlación binaria” coeficiente de correlación de Pearson o de Spearman.

Procedimiento de “Regresión lineal múltiple” se ha aplicado para determinar la contribución de varios factores (variables independientes) en un simple evento o resultado (variable dependiente o respuesta).

#### Asociación de variables cualitativas

Prueba de independencia de “Chi cuadrado” se ha aplicado para analizar si dos variables dicotómicas están asociadas y el test “exacto de Fisher” cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña.

Procedimiento de “regresión logística” se ha aplicado para determinar el grado de relación (odds ratio) entre variables dependientes o variables de respuesta binomialmente distribuidas (variables categóricas) con un intervalo de confianza (IC) del 95%

#### Análisis de supervivencia

Prueba de “kaplan-Meier” se ha aplicado para determinar las curvas de supervivencia

Prueba de logaritmo del rango “log-rank” se ha aplicado para comparar dos distribuciones de supervivencia (curvas de supervivencia).

Regresión de COX se ha aplicado para estimar la razón de riesgo (hazard ratio) como una función del tiempo y de las variables pronóstico.

#### Sensibilidad y especificidad de una variable como prueba diagnostica

Procedimiento Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) se ha aplicado para calcular la sensibilidad y especificidad de una variable como prueba diagnostica, y para estimar el mejor punto de corte, con mayor sensibilidad y menor 1-especificidad, que produzca un diagnostico más preciso.

### **4.5. Aspectos éticos.**

Los pacientes y controles incluidos en el presente estudio proceden del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Cada paciente incluido en el estudio fue debidamente informado y firmó su autorización para participar en el mismo mediante consentimiento informado, adjunto al final de ésta tesis doctoral.

El proyecto fue aprobado por el Comité Etico de Investigación Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Se respetaron los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y a la biomedicina y en la Declaración Universal de la UNESCO sobre genoma humano y derechos humanos, así como lo establecido en la legislación española para la investigación biomédica y bioética. Los datos del estudio están identificados mediante un código y están disociados. La propiedad y custodia de la base de datos es del equipo investigador, según lo dispuesto en la ley 15/99.

#### **4.6. Limitaciones del estudio**

Debido al mal pronóstico de la enfermedad, muchos de los pacientes incluidos no pudieron concluir el estudio, por tanto no se pudo recoger la segunda muestra.

Este estudio no es un ensayo clínico, los pacientes incluidos en el mismo fueron tratados de acuerdo con el protocolo asistencial del servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, y a igual estadio clínico no todos los pacientes recibieron el mismo tratamiento. Sólo recibieron bevacizumab 12 pacientes, lo cual limita las conclusiones sobre el valor de las variables como marcadoras de respuesta.

La puesta a punto de la técnica de las EPCs retrasó el inicio del estudio de sus niveles en los pacientes incluidos en el estudio, por tanto no pudo realizarse en todos los pacientes.



## 5-RESULTADOS



4.

5.

6.

7.

8.

9.

10.

11.

12.

13.

14.

15.

16.

17.

18.

19.

20.

21.

22.

23.

24.

25.

26.

27.

28.

29.

30.

31.

32.

33.

34. 5.1. Descriptivo.

Se estudiaron 60 pacientes que corresponden a primeras visitas de Oncología Médica con diagnóstico de carcinoma pulmonar no microcítico entre el 1 de enero de 2009 y el 30 de setiembre de 2010.

La edad media fue de 62 años (41-85 años), siendo en su mayoría hombres (90%) fumadores (80%). El estado general de los pacientes estudiados era bueno, con un PS 0-1 en un 91,7% de los casos. En la Tabla 1 se pueden observar las características basales de los pacientes.

**Tabla 5.1.** Características basales de los 60 pacientes con CPNM y de los 60 controles.

	Pacientes	Controles	p
Edad (años) (media y rango)	61,6 ± 9,7	59,1± 8,8	0,2
Sexo (hombres)	54(90%)	51(85%)	0,4
Fumador	48 (80 %)		
Ex fumador	8 (13,3%)		
No fumador	4 (6,7%)		
PS 0-1 basal	55 (91,7%)		
PS 2 o mayor basal	5 (8,3%)		
Histología			
Carcinoma epidermoide	21 (35%)		
Adenocarcinoma	24(40%)		
Células. indiferenciadas	10 (16,7%)		
Células grandes	5 (8,3%)		
Estadio Clínico			
III inoperables	23 (39,6%)		
IV	37 (60,3%)		
Presencia de metástasis			
Cerebrales	9 (15%)		
Pulmonares	14 (23,3%)		
Hepáticas	6(10%)		
Suprarrenales	12 (20%)		
Ósea	17(28,3%)		
Pleurales	4 (7%)		

De los 21 pacientes en el estadio clínico III, 18 pacientes corresponden a estadio IIIB. De los pacientes fumadores, 32 pacientes (61,5%) fumaban más de 40 cigarrillos al día, 18 pacientes (34,6%) entre 10-40 cigarrillos / día y menos de 10 cigarrillos/ día sólo 2 pacientes (3,8%). De los pacientes ex fumadores, 10 pacientes habían dejado de fumar 5 años antes del diagnóstico y 1 paciente entre 1 y 5 años antes.

Tratamiento.

Los pacientes fueron tratados con quimioterapia basada en platinos asociados a taxanos o pemetrexed +/- bevacizumab según protocolo asistencial del servicio de oncología médica. En la tabla 2 se observan los tratamientos administrados.

**Tabla 5.2:** Distribución de los pacientes según esquema de tratamiento.

Quimioterapia	N pacientes	Porcentaje
Cisplatino + docetaxel	32 <sup>(1)</sup>	53,3
Carboplatino + taxol	12 <sup>(2)</sup>	20
Cisplatino + pemetrexed	3 <sup>(3)</sup>	5
Cisplatino + docetaxel + bevacizumab	6	10
Carboplatino + taxol + bevacizumab	2	3,3
Cisplatino + pemetrexed + bevacizumab	4	6,7
Otros	1	1,7

<sup>(1)</sup> seis de los pacientes recibieron tratamiento concomitante con radioterapia (Estadio II inoperables y III)

<sup>(2)</sup> seis de pacientes recibieron concomitancia con radioterapia (Estadio III)

<sup>(3)</sup> tres pacientes recibieron concomitancia con radioterapia (Estadio III).

Completaron 6 ciclos de quimioterapia 31 pacientes (51,7%), 5 ciclos un total de 10 pacientes (16,7%), 4 ciclos de quimioterapia 5 pacientes (8,3%), 3 ciclos de quimioterapia 5 pacientes (8,3%), 2 ciclos 4 pacientes (6,7%) y 5 pacientes (8,3%) sólo recibieron 1 ciclo de quimioterapia.

#### Toxicidad del tratamiento.

La toxicidad asociada al tratamiento más destacable fue la hematológica con un 15% de casos de fiebre en situación de neutropenia grados 3-4 y 2 casos de muerte por toxicidad hematológica. Estos casos se vieron en pacientes tratados con cisplatino + docetaxel. En la tabla 3 se observan los datos de toxicidad relacionada con el tratamiento.

**Tabla 5.3:** Toxicidad asociada al tratamiento.

Toxicidad	N pacientes	Porcentaje
<b>Hematológica grados 3-4</b>		
Anemia	5	8,3
Trombopenia G 3-4	1	1,7
Fiebre en situación de neutropenia grado 3-4	9	15
Ingresos por toxicidad hematológica grado 3-4	7	11,7
Muertes por toxicidad hematológica grado 3-4	2	3,3
<b>Digestiva</b>		
Emesis grado 2-3	8	13,3
Diarrea grado 2-3	3	5
Mucositis grado 3	2	3,3
Anorexia grado 2-3	7	11,7
<b>Neurológica</b>		
Neuropatía periférica grado 2-3 relacionada con tratamiento	2	3,3
<b>Otras</b>		
Astenia grados 2-3	15	25
Reacción alérgica durante infusión de docetaxel	1	1,7
Hemorragia pulmonar grado 3	2	3,3
Necesidad de soporte con estimulantes de colonias (G-CSF)	6	10
Necesidad de soporte con Eritropoyetina alfa (EPO-alfa)	5	8,3

*Fenómenos trombóticos:* Sólo en 2 pacientes tratados se evidenció clínicamente episodios trombóticos durante el tratamiento: un paciente presentó tromboembolismo pulmonar que evolucionó favorablemente tras iniciar anticoagulación con heparina de bajo peso molecular (HBPM) y otra paciente presentó una trombosis venosa profunda con evolución también favorable con HBPM. Ambos pacientes recibieron tratamiento con cisplatino asociado a docetaxel. Dos pacientes presentaron cuadro de hemorragia pulmonar grave, uno de ellos en tratamiento con bevacizumab.

#### Respuesta clínica

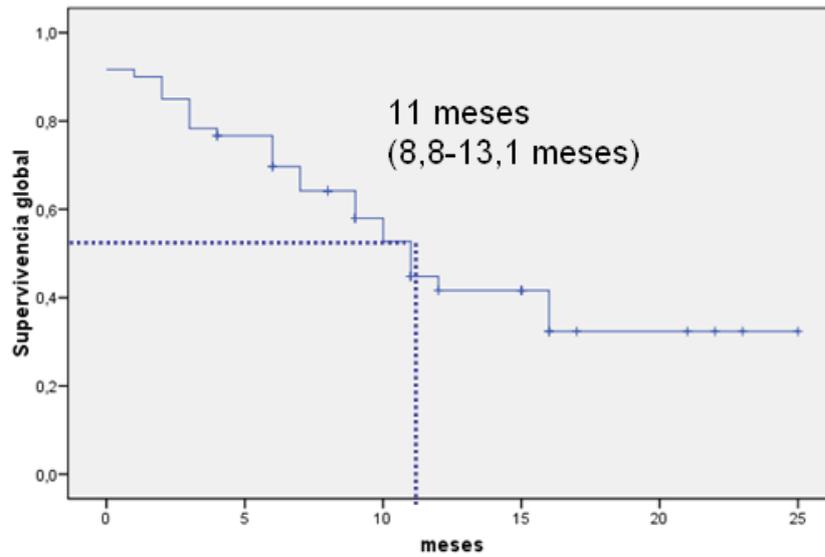
De los 60 pacientes estudiados, 9 pacientes no se pudo valorar esta respuesta, porque no completaron los 3 primeros ciclos de tratamiento debido a exitus o mala tolerancia al mismo. Se observó respuesta clínica completa en un paciente, respuesta parcial en 34, y enfermedad estable en 5 pacientes, alcanzando un 66% de respuesta y estabilidad de las lesiones (Tabla 5.4.).

**Tabla 5.4.** Respuesta clínica al tratamiento de los 51 pacientes estudiados.

Respuesta clínica	Pacientes
Respuesta completa	1
Respuesta parcial	36 (60%)
Enfermedad estable	6 (10%)

#### Supervivencia

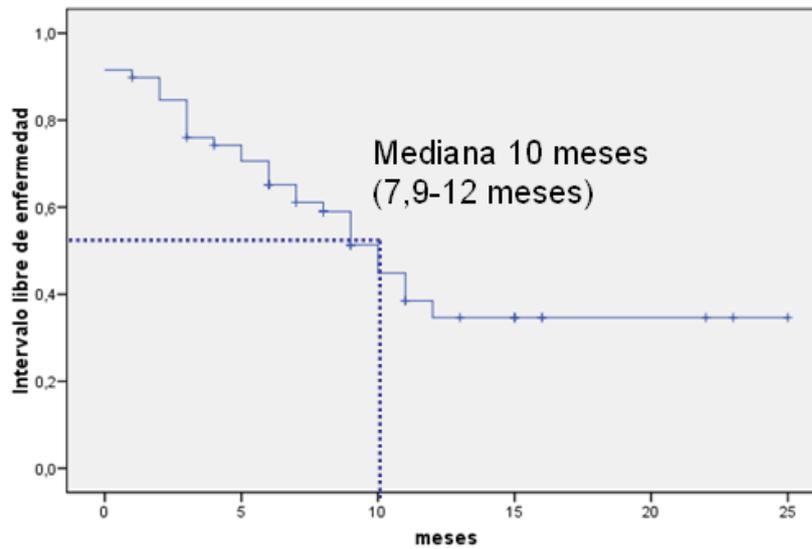
Los resultados del estudio de supervivencia realizado sobre los 59 muestran que la mediana de la supervivencia global (Figuras 5.1.) fue de 11 meses (IC 95% 8,8-13,1 meses) y que la mediana de la supervivencia libre de progresión (Figura 5.2.) fue de 10 meses (IC 95% 7,9-12).



N pacientes

59	40	15	7	3	0
----	----	----	---	---	---

Figura 5.1. Supervivencia Global



N pacientes

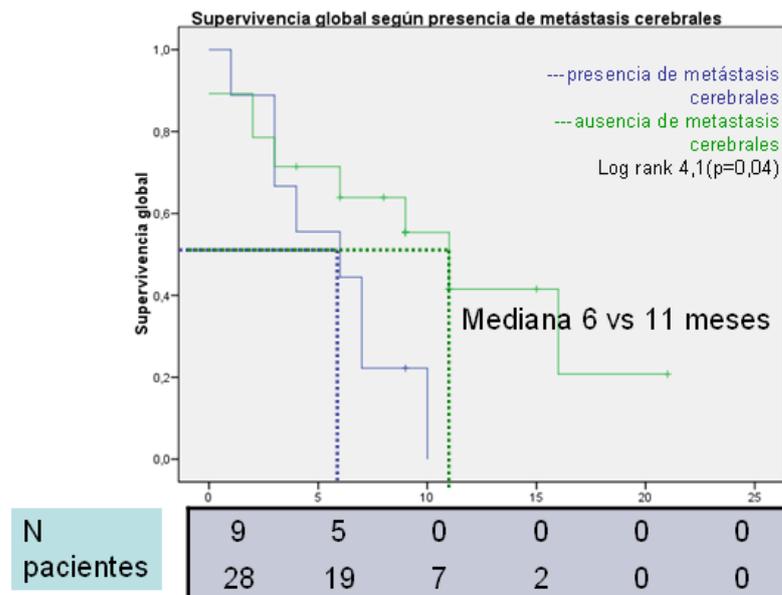
59	40	15	7	3	0
----	----	----	---	---	---

Figura 5.2 Intervalo Libre de Enfermedad

En los 37 pacientes con estadio IV se ha estudiado la supervivencia según el tipo de metástasis al diagnóstico, los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.5, donde se observa que la ausencia de metástasis y su localización, muestra una tendencia a incrementar la supervivencia y que sólo alcanza el valor de significación en las metástasis cerebrales (Figura 5.3.)

**Tabla 5.5.** Supervivencia según localización de la metástasis al diagnóstico en los pacientes con CPNM estadio IV

Tipo metástasis	Supervivencia		Chi cuadrado/HR	P
	Con metástasis	Sin metástasis		
Hepáticas	7 meses (2,2-11,8)	9 meses(5,6-12,3)	0,2	0,7
<b>Cerebrales</b>	<b>6 meses(0,2-11,8)</b>	<b>11 meses(7,8-14)</b>	<b>4,1</b>	<b>0,04</b>
			<b>HR=2,4 (0,9-5,9)</b>	<b>0,06</b>
Pulmonares	9 meses(5,6-12,3)	9 meses(5,2-12,7)	0,2	0,7
Suprarrenales	6 meses(0-12,7)	9 meses(5,5-12,5)	0,002	0,9
Oseas	9 meses (3,5-14,4)	9 meses ( 2,5-15,4)	0,2	0,7
Pleurales	9 meses	9 meses(5,3-12,6)	0,03	0,8



**Figura 5.3.** Supervivencia global según presencia de metástasis cerebrales.

La mediana de supervivencia en aquellos pacientes con respuesta parcial, enfermedad estable y progresión fue de 16 meses, 9 meses y 3 meses respectivamente según se observa en la Tabla 5.6 y en la Figura 5.4.

**Tabla 5.6. Supervivencia según respuesta al tratamiento.**

Tipo de respuesta	Mediana de supervivencia	Log rank	P
Respuesta parcial	16 meses	56,7	<0,0001
Enfermedad estable	9 meses		
Progresión de enfermedad	3 meses		

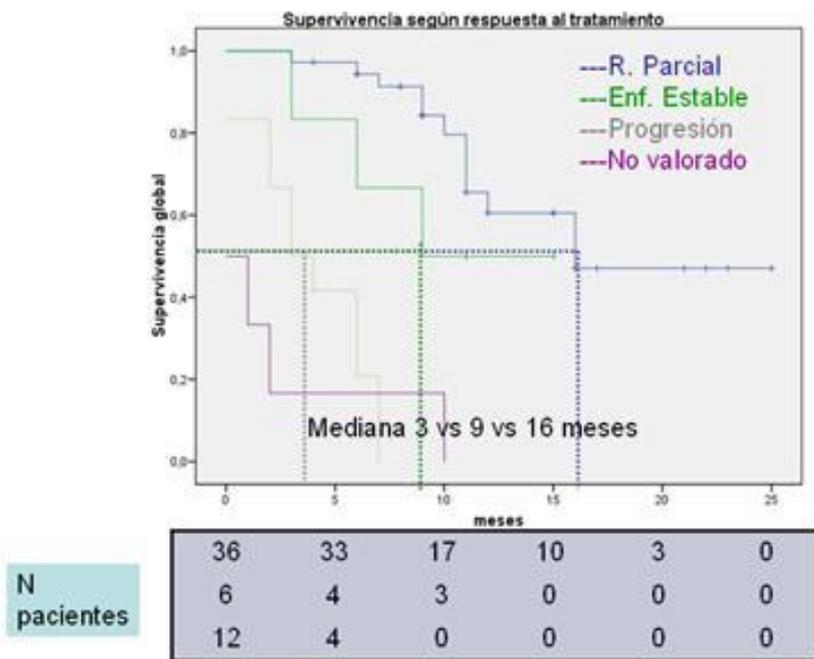
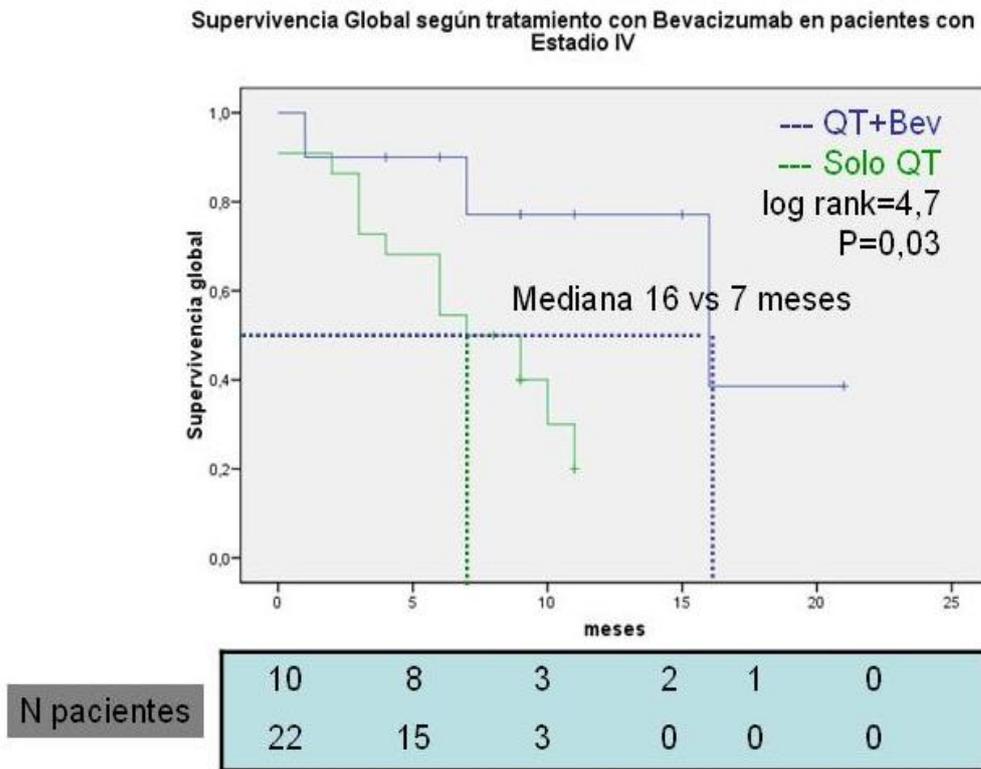


Figura 5.4. Supervivencia según respuesta al tratamiento.

La mediana de supervivencia en el grupo de pacientes estadio IV tratados con bevacizumab fue de 16 meses, según se observa en la Figura 5.5.



**Figura 5.5.** Supervivencia global según tratamiento con bevacizumab en pacientes con estadio IV. HR=0,23 (0,05-1,001) p=0,05

## **5.2 Análisis de marcadores de angiogénesis, daño endotelial e inflamación**

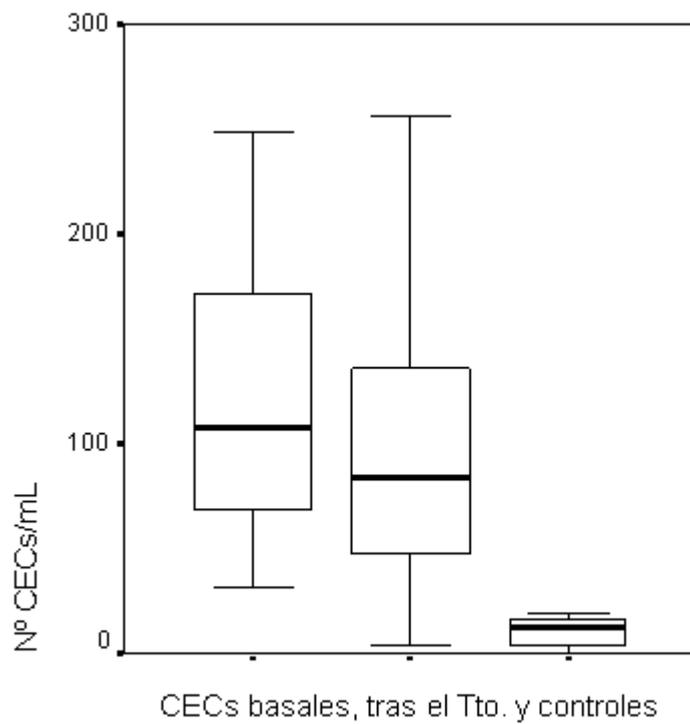
De estos pacientes, se realizó el estudio de marcadores de angiogénesis, daño endotelial e inflamación en los 60 pacientes. Se estudiaron los siguientes parámetros de angiogénesis: CECs, EPCs, MPs, TSP1, el VEGF, el receptor 1 y 2 del VEGF; de coagulación: GET y el FT y de inflamación: la IL6.

En el análisis de las variables antes y después del tratamiento respecto a los controles, se observa en general que los parámetros de las CECs, EPCs, MPs, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, FT e IL6 se encuentran elevados significativamente respecto a los controles, según se observa en la Tabla 5.7 y en las Figuras 5.6-8.

**Tabla 5.7:** Niveles de los marcadores de angiogénesis, inflamación y coagulación en pacientes con CPNM antes (n=59) y después del tratamiento (n=36) con quimioterapia y en sujetos sanos.

	<b>Antes del tratamiento (n=59)</b>	<b>Después del tratamiento (n=36)</b>	<b>Sujetos sanos (n=60)</b>	<b>p1</b>	<b>p2</b>	<b>p3</b>
CEC (cel /ml)	101,1±76,0	158,9±10,8	10,8±6,3	0,2455	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,01</b>
EPC(cel /ml)*	41,7±94,9	32,0±34,1	12,1±14,9	0,6	0,05	<b>0,013</b>
MPs (MPs/uL)	6035±5749	4999±4706	1848±2058	0,4	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
TSP1 (ng/ml)	45,2±16,4	43,7±10,1	48,2±9,5	0,7	0,3	0,08
VEGF (pg/ml)	407,7±371,8	325,1±279,1	146,9±59,4	0,3	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0002</b>
VEGFR1 (pg/ml)	128,1±90,5	108,6±44,3	71,5±17,5	0,2	<b>0,0007</b>	<b>0,004</b>
VEGFR2 pg/ml	9515±5713	8807±2880	6727±1307	0,5	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,0001</b>
FT (pg/ml)	508,0±508,4	392,6±471,6	162,0±54,0	0,3	<b>0,0004</b>	<b>0,003</b>
GET (nMol)	201± 82,4	183,1±70,8	157,8±59,2	0,3	<b>0,01</b>	0,3
IL6 (pg/ml)	12,9±13,6	11,0±11,5	0,7±0,6	0,5	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

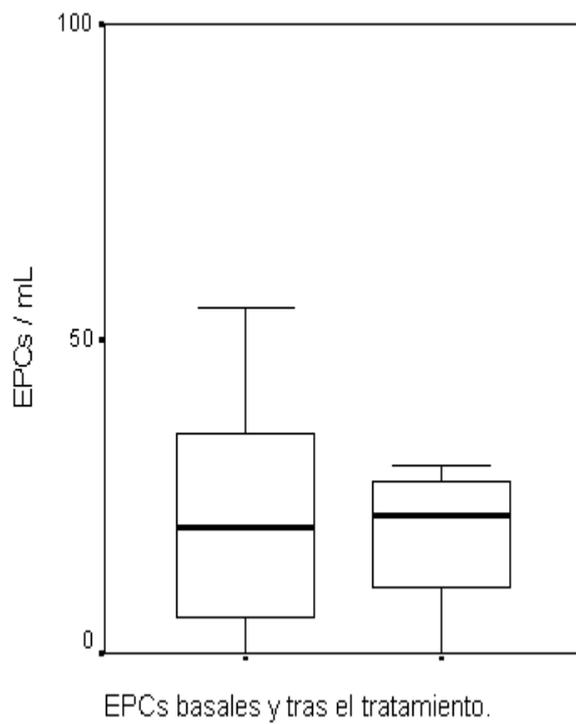
CEC: célula endotelial circulante; EPC: célula progenitora endotelial; MPs: micropartículas; TSP1: trombospondina 1 VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; VEGFR1: receptor 1 del VEGF; VEGFR2: receptor 2 del VEGF; FT: factor tisular; GET: generación endógena de trombina; IL6 interleukina 6. p1, Antes del tratamiento vs Después del tratamiento; p2, Antes del tratamiento vs Control; p3, Después del tratamiento vs Control). \*La determinación de EPCs antes y después del tratamiento se realizó en 18 pacientes.



**Figura 5.6.** Distribución de los niveles de las CECs en pacientes con CPNM en situación basal, tras el tratamiento y en los controles.

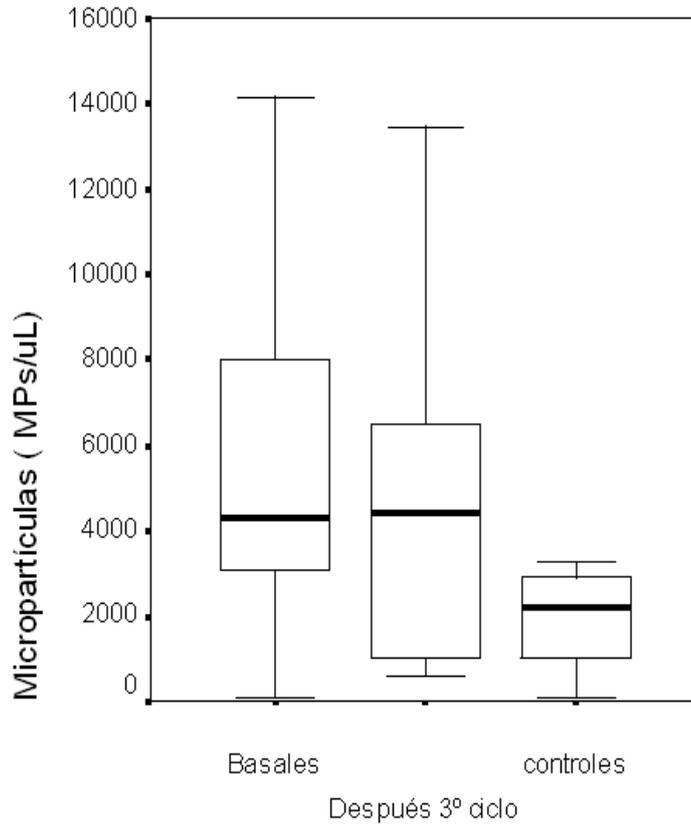
$p_1 = 0,25$ ;  $p_2 < 0,0001$ ;  $p_3 = 0,01$ .  $p_1$ , Antes del tratamiento vs Después del tratamiento;  $p_2$ , Antes del tratamiento vs Control;  $p_3$ , Después del tratamiento vs Control).

Las líneas horizontales representan el valor del primer cuartil, de la mediana, del tercer cuartil y los valores máximo y mínimo.



**Figura 5.7.** Distribución de los niveles de EPCs en pacientes con CPNM en situación basal y tras el tratamiento.

P =0,6, Antes del tratamiento vs después del tratamiento Las líneas horizontales representan el valor del primer cuartil, de la mediana, del tercer cuartil y los valores máximo y mínimo.



**Figura 5.8.** Distribución de los niveles *MPs* circulantes en pacientes con CPNM en situación basal, tras el tratamiento y en controles.  $p_1=0,4$ ;  $p_2$  y  $p_3<0,0001$ .  $p_1$ , Antes del tratamiento vs Después del tratamiento;  $p_2$ , Antes del tratamiento vs Control;  $p_3$ , Después del tratamiento vs Control. Las líneas horizontales representan el valor del primer cuartil, de la mediana, del tercer cuartil y los valores máximo y mínimo.

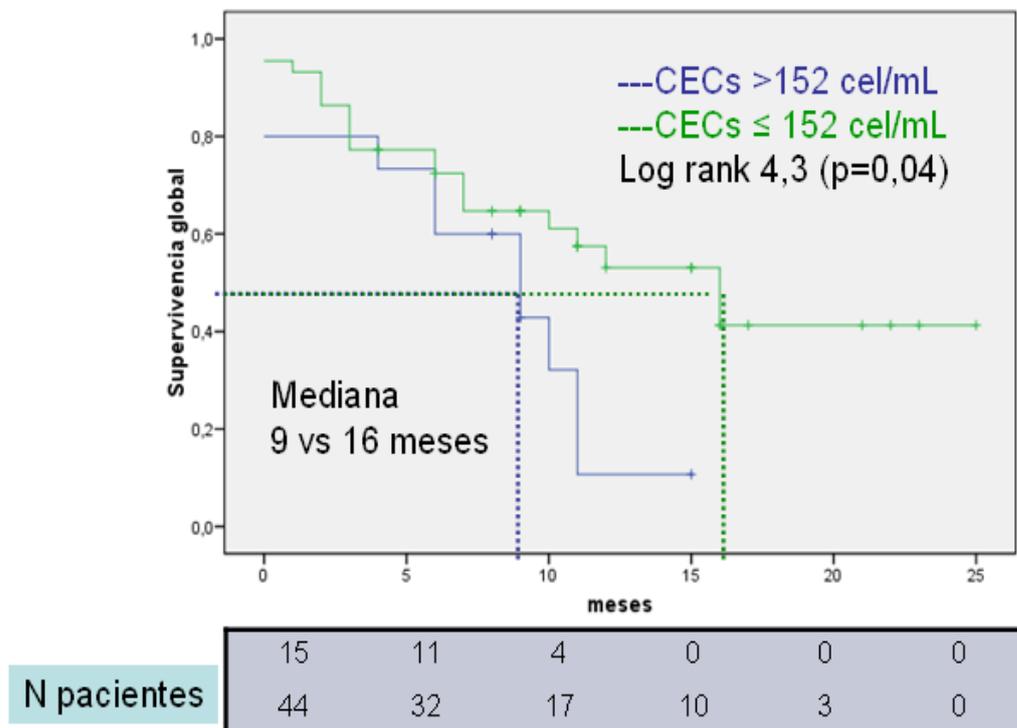
### 5.3. Valor pronóstico de los niveles basales de las variables estudiadas

Cuando se agruparon los pacientes de acuerdo con el valor de las CECs del percentil 75 de los pacientes, se observó (Tabla 5.8 y Figura 5.9) que el grupo de pacientes con los niveles de CECs elevados por encima del percentil 75, se asociaron a una peor supervivencia que los pacientes del grupo con niveles de CECs menor que el valor del percentil 75.

**Tabla 5.8.** Supervivencia Global en el grupo de pacientes con los niveles basales de CECs mayores del percentil 75 (152 cel/ml).

Variable	Percentil	Mediana SG si variable alterada	Mediana SG si variable normal	Chi cuadrado	p
CEC>152 cel/m	75	9(4,3-13,6)	16 (9,9-22)	4,3	P=0,04

CEC: célula endotelial circulante;



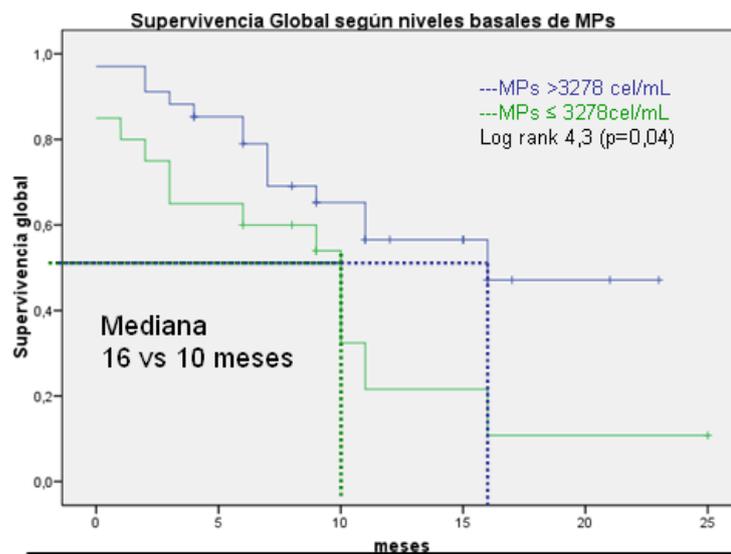
**Figura 5.9.** Supervivencia global según niveles basales de CECs. HR=2,1 (1,004-4,5) p<0,05

Por otra parte, al analizar la supervivencia según la elevación de las variables por encima del percentil 99 de los controles, se observó que los pacientes con MPs elevadas tenían una mayor supervivencia, y que aquellos pacientes con niveles disminuidos de TSP1 (menores al percentil 25 de los controles), presentaban una peor supervivencia.(Tabla 5.9 y figuras 5.10 y 5.11)

**Tabla 5.9.** Comparación de supervivencia global según los niveles basales de las variables (respecto al percentil 99 de los controles).

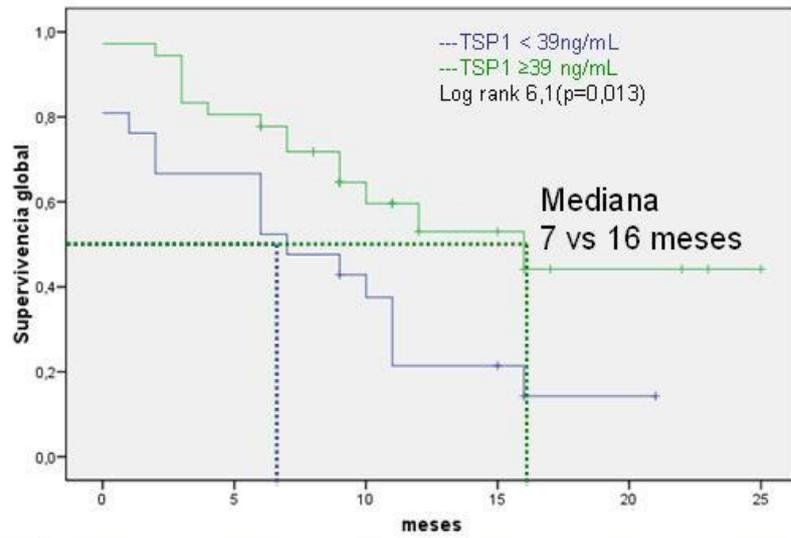
Variable	Mediana SG si variable alterada	Mediana SG si variable normal	Chi cuadrado	p
CEC>20cel/ml	8	11 (8,9-13)	0,52	P=0,5
EPCs > 60 cel/ml	8	8 (4,9-11)	0,05	0,8
<b>MPs &gt; 3278 MP/μl</b>	<b>16</b>	<b>10(6,1-13,8)</b>	<b>4,3</b>	<b>P=0,04</b>
<b>TSP1 &lt;39 pg/ml</b>	<b>7(0,7-13,2)</b>	<b>16 (7-24,9)</b>	<b>6,1</b>	<b>0,013</b>
VEGF >253 pg/ml	10(5,5-14,4)	11 (8-13,9)	0,4	0,5
sVEGF1 >125 pg/ml	9 (0,8-17,1)	12(8,1-15,8)	1,7	0,2
VEGFR2 >7960 pg/ml	12 (7,8-16)	9 (5,5-12,4)	2,7	0,09
FT >265 pg/ml		11(6,6-15,3)	0,58	P=0,4
GET >275 nMol	7 (0,11-13,8)	11 (6,6-15,3)	0,05	0,8
IL6>2,5 pg/ml	11 (8,6-13,3)	10 (3,5-16,4)	0,22	0,6

CEC: célula endotelial circulante; EPCs: células progenitoras endoteliales; MPs: micropartículas; TSP1: trombospondina 1 VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; sVEGF1: receptor 1 soluble del VEGF; VEGFR2: receptor 2 del VEGF; FT: factor tisular; GET: generación endógena de trombina; IL6 interleukina 6.



N pacientes	37	31	19	11	5	0
	23	16	7	4	0	0

**Figura 5.10.** *Supervivencia Global según niveles basales de MPs.* HR=0,46 (0,2-0,995) p<0,05.



N	21	15	7	3	1	0
pacientes	36	28	12	6	3	0

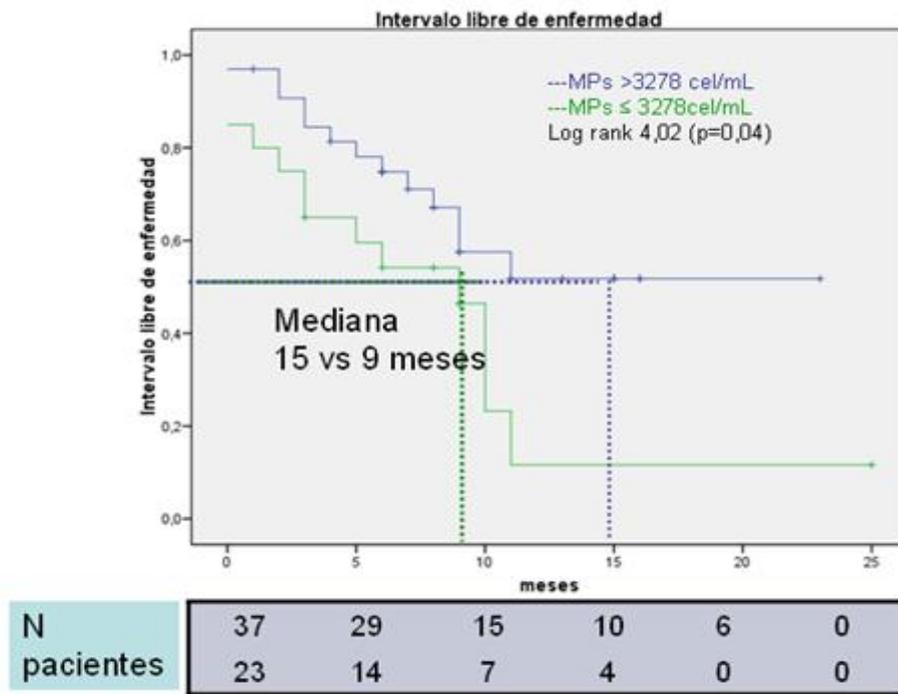
**Figura 5.11.** Supervivencia Global según niveles basales de TSP1 (Percentil 25 de la variable en controles). HR= 2,2(1,1-4,5) p=0,02

Al realizar el análisis del ILE, según la variación de los parámetros respecto al percentil 99 de los controles, se observó que aquellos pacientes con MPs elevadas tenían un mayor ILE y por otra parte aquellos con TSP1 disminuida (menores al percentil 25 de los controles) un ILE más corto. (Tabla 5.9 y Figuras 5.12 y 5.13)

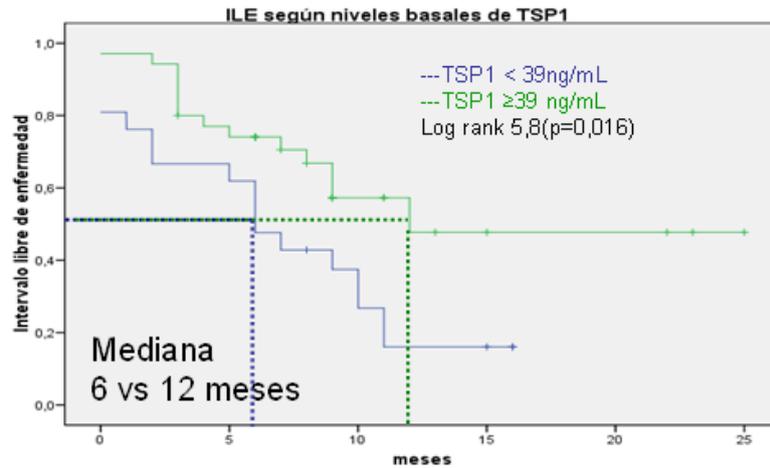
**Tabla 5.10.** Comparación del ILE según las variables basales se encuentren elevadas o no respecto al valor del percentil 99 de los controles.

Variable	Mediana ILE si variable alterada	Mediana ILE si variable normal	Chi cuadrado	p
CEC>20 cel/ml	9(6-11)	10 (7,9-12)	0,64	0,4
EPCs > 60 cel/ml	8	8 (5,7-10,2)	0	1
<b>MPs &gt; 3278 MP/ul</b>	<b>15 (11,4-18)</b>	<b>9 (8-12)</b>	<b>4,02</b>	<b>0,04</b>
<b>TSP1 &lt;39 pg/ml</b>	<b>6 (3,7-8,2)</b>	<b>12</b>	<b>5,8</b>	<b>0,02</b>
VEGF>253 pg/ml	9 (5,5-12,4)	10(7,9-12)	0,4	0,5
sVEGF1>125 pg/ml	9(3,6-14,3)	10 (7,9-12)	0,08	0,8
VEGFR2>7960 pg/ml	11 (9,1-12,8)	7 (4,2-9,7)	2,1	0,2
FT >265 pg/ml		9(5,7-12,2)	1,1	0,3
GET >275 nMol	6(0-14)	11	1,5	0,2
IL6>2,5 pg/ml	10(7,8-12,1)	5 (0-10,8)	1,2	0,3

CEC: célula endotelial circulante; EPCs: células progenitoras endoteliales; MPs: micropartículas; TSP1: trombospondina 1 VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; sVEGF1: receptor 1 soluble del VEGF; VEGFR2: receptor 2 del VEGF; FT: factor tisular; GET: generación endógena de trombina; IL6 interleukina 6.



**Figura 5.12.** ILE según niveles de MPs basales. HR=0,47 (0,2-1) p=0,06.



N pacientes	21	13	6	2	0	0
	35	25	7	3	2	0

Figura 5.13. ILE según niveles basales de TSP1. HR=2,2 (1,1-4,6)p=0,02.

Se observó una asociación entre los valores elevados del VEGF (valor del percentil 99 de los controles) y la progresión de enfermedad según se observa en la Tabla 5.11. No se encontró otra variable que se asocie significativamente con la progresión de enfermedad al realizar el corte en el valor del percentil 99 de los controles.

**Tabla 5.11.** Asociación entre la progresión y los valores de las variables, en los pacientes con CPNM antes del tratamiento con quimioterapia.

	<i>Progresión de enfermedad</i>		Chi-cuadrado	P	Odds ratio	IC 95%
	SI	NO				
<b>CECs&gt;20 cel/ml</b>						
Si	12	40	0,3	0,6	1,8	0,2-16,9
No	1	8				
<b>EPCs&gt;60</b>						
Si	0	1	0,3	0,6	1,3	0,9-1,7
No	6	20				
<b>MPs &gt;3278 Mps/ml</b>						
Si	8	33	0,07	0,8	0,7	
No	5	14				0,03-11,7
<b>VEGF&gt;253 pg/ml</b>						
<b>Si</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>5,3</b>	<b>0,02</b>	<b>6</b>	<b>1,1-31,8</b>
<b>No</b>	<b>2</b>	<b>27</b>				
<b>TSP1&lt;39 ng/ml</b>						
Si	2	8	0,1	0,8	1,3	
No	10	40				0,2-7,8
<b>sVEGF1&gt;125 pg/ml</b>						
Si	5	18	0,004	0,9	0,9	0,2-4,2
No	8	28				
<b>VEGFR2&gt;7960 pg/ml</b>						
Si	8	31	0,03	0,8	0,9	0,2-3,5
No	5	15				
<b>FT &gt;265 pg/ml</b>						
Si	5	25	1	0,4	0,5	0,12-1,9
No	8	21				
<b>GET &gt;275nMol</b>						
Si	4	6	1,2	0,3	2,4	0,5-12,5
No	10	40				
<b>IL6&gt;3 pg/ml</b>						
Si	8	32	0,12	0,7	0,8	0,2-3,1

CECs: células endoteliales circulantes; EPCs: células progenitoras endoteliales; MPs: micropartículas; VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; TSP1: trombospondina 1; sVEGF1 receptor soluble 1 del VEGF; VEGFR2 receptor 2 del VEGF FT: factor tisular; GET: generación endógena de trombina; IL6, interleukina 6.

#### 5.4. Correlación de las variables estudiadas:

Se observó una correlación entre el VEGF y las MPs ( $r=0,406$ ), así como el VEGFR2 con el VEGF ( $r=0,565$ ) como era de esperar y también la GET con las MPs ( $r=0,509$ ) según se observa en la Tabla 5.12.

**Tabla 5.12:** Estudio de correlación de Pearson entre las variables estudiadas en los pacientes con CPNM antes del tratamiento con quimioterapia.

	CPC	CPECs	Cd34/133	MPs	VEGF	VEGFR2	GET
<b>CPC (cel/ ml)</b>							
<b>CPEC (cel /ml)</b>	0,859 **						
<b>Cd34/133 (cel/ml)</b>	0,973 **	0,735 **					
<b>MPs (MPs/uL)</b>							
<b>VEGF (pg /ml)</b>				0,406 **			
<b>VEGFR2 (pg/ml)</b>					0,565 **		
<b>GET (nMol)</b>				0,509 **			

CPC: célula progenitora circulante / ml; CPEC célula progenitora endotelial circulante / ml; Cd34/133: células CD34/133+; MPs: micropartículas en plasma/ uL; VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; VEGFR2: receptor 2 del VEGF; GET generación de trombina.

### **5.5. Valor pronóstico y predictivo de las variables tras el tratamiento:**

Al realizar el análisis de asociación de las variables medidas tras el tratamiento, con la supervivencia > 15 meses se observó una asociación entre la elevación de las MPs tras el tratamiento y la supervivencia > 15 meses según se observa en la Tabla 5.13. La sensibilidad y especificidad de las MPs para esta asociación fue de un 88,9% y de un 62,5% respectivamente como se observa en la Tabla 5.14. No se observó otra variable que sea significativa para esta asociación.

**Tabla 5.13.** Asociación entre supervivencia >15 meses (S>15m) y los valores de las variables, en los pacientes con CPNM después del tratamiento con quimioterapia

	<b>Supervivencia &gt;15 meses</b>					
	Si	No	Chi-cuadrado	p	Odds ratio	IC 95%
<b>CECs&gt;20 cel/ml</b>						
Si	9	20	2,9	0,09	0,7	0,5-0,9
No	0	7				
<b>MPs &gt;3278 MPs/uL</b>						
<b>Si</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>4,9</b>	<b>0,02</b>	<b>9,4</b>	<b>1,02-87</b>
<b>No</b>	<b>1</b>	<b>13</b>				
<b>VEGF&gt;253 (pg/ml)</b>						
Si	2	18	0,6	0,6	0,24	0,1-3,8
No	4	23				
<b>sVEGF1&gt;125 pg/ml</b>						
Si	2	8	0,3	0,6	0,6	0,1-3,8
No	7	18				
<b>VEGFR2&gt;7960 pg/ml</b>						
Si	5	18	0,6	0,4	0,6	0,1-2,6
No	4	8				
<b>FT &gt;265 pg/ml</b>						
Si	3	10	0,04	0,8	0,8	0,2-4,1
No	6	17				
<b>GET &gt;275nMol</b>						
Si	2	4	0,2	0,6	1,5	0,3-10
No	7	22				
<b>IL6&gt;3 pg/ml</b>						
Si	6	20	0,4	0,5	0,6	0,1-3,1
No	3	6				

CECs: células endoteliales circulantes; MPs: micropartículas; VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; TSP1: trombospondina 1; sVEGF1: receptor 1 soluble del VEGF; VEGFR2: receptor 2 del VEGF; FT: factor tisular; GET: generación endógena de trombina; IL6: interleukina 6.

**Tabla 5.14.** Sensibilidad y especificidad de las técnicas para detectar largos supervivientes

Variable	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Área bajo la curva
MPs y Supervivencia > 15 meses	88,9%	62,5%	76,90%

MPs: micropartículas

Al realizar el análisis de ILE tras el tratamiento, no se observó diferencias entre los grupos según los niveles de las variables según se observa en la Tabla 5.15 ni tampoco una asociación con los eventos trombóticos.

**Tabla 5.15.** Comparación de ILE según las variables tras el tratamiento se encuentren elevadas o no respecto al valor del percentil 99 de los controles.

	Mediana ILE		Chi-cuadrado	p
	Variable elevada	Variable no elevada		
CEC>20 cel/ml	12	10 (8,6-11)	0,5	0,45
EPCs > 60 cel/ml	7,5 (5-10)	10 (8,6-11)	0,5	0,5
MPs > 3278 MP/ul		12 (3,5-20,4)	0,2	0,7
TSP1 <39 pg/ml	11	12	0,26	0,6
VEGF >253 pg/ml	11	11 (8,2-13,7)	0,09	0,8
sVEGF1 >125 pg/ml	12	12	0,03	0,9
VEGFR2 >7960 pg/ml	11	11 (8,4-13,5)	0,9	0,3
FT >265 pg/ml	12	12 (9,4-14,6)	0,02	0,9
GET >275 nMol	11 (10,1-11,8)		0,9	0,3

CEC: célula endotelial circulante; EPCs: células progenitoras endoteliales; MPs: micropartículas; TSP1: trombospondina 1 VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; sVEGF1: receptor 1 soluble del VEGF; VEGFR2: receptor 2 del VEGF; FT: factor tisular; GET: generación endógena de trombina; IL6 interleukina 6.

### 5.6. Influencia del bevacizumab sobre las variables.

Respecto a la influencia del bevacizumab sobre las variables, se observó una diferencia significativa entre los valores de las EPCs ( $p=0.01$ ) y la GET ( $p=0,043$ ) según hayan recibido o no bevacizumab. (Tabla 5.16)

**Tabla 5.16.** Asociación entre los valores de las variables tras el tratamiento según hayan recibido o no bevacizumab.

Variable	Bevacizumab si	Bevacizumab no	p
EPC (cel/ ml)	11,6±4,1 (5)	38,3±9,1 (16)	0,01
GET (nMol)	1001±829(7)	168±14,1 (28)	0,043

EPC: célula progenitora endotelial; GET: generación endógena de trombina

El análisis multivariante (Tablas 5.17 y 5.18), muestran la influencia del bevacizumab sobre los parámetros de angiogénesis y coagulación estudiados tras el tratamiento.

**Tabla 5.17.** Modelo 1: Análisis multivariable de la influencia del Bevacizumab sobre el valor de los parámetros estudiados.

Variables introducidas	R	R <sup>2</sup>	F	Coficiente Beta	p
<b>Resumen</b>	0,998	0,997	54,8		
<b>Constante</b>					0,016
CEC				0,89	0,03
EPC				-1,93	0,04
MPs				0,41	0,2
TSP1				-0,61	0,009
VEGF				0,77	0,008
SVEGF1				0,94	0,02
VEGFR2				0,11	0,3
GET				-2,6	0,01
IL6				0,3	0,07

Variable dependiente: Bevacizumab. Variables predictoras: CEC: célula endotelial circulante; EPC: célula progenitora endotelial; MPs: micropartículas; TSP1: trombospondina 1 VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; sVEGF1: receptor 1 soluble del VEGF; VEGFR2: receptor 2 del VEGF; FT: factor tisular; GET: generación endógena de trombina; IL6 interleukina 6. R: coeficiente de múltiples correlaciones; R2 coeficiente de determinación; F ANOVA estadístico; coeficiente Beta: coeficiente de regresión estandarizado.

**Tabla 5.18.** Modelo 2: Análisis multivariable de la influencia del Bevacizumab sobre el valor de los parámetros estudiados

Variables introducidas	R	R <sup>2</sup>	F	Coefficiente Beta	p
<b>Resumen</b>	0,968	0,937	11,08		
<b>Constante</b>					0,000
CEC				0,66	0,05
EPC				-1,26	0,04
TSP1				-0,64	0,003
VEGF				0,75	0,005
SVEGF1				0,56	0,03
GET				-1,89	0,03

Variable dependiente: Bevacizumab. Variables predictoras: CEC: célula endotelial circulante; EPC: célula progenitora endotelial; MPs: micropartículas; TSP1: trombospondina 1 VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular; sVEGF1: receptor 1 soluble del VEGF; VEGFR2: receptor 2 del VEGF; FT: factor tisular; GET: generación endógena de trombina; IL6 interleukina 6. R: coeficiente de múltiples correlaciones; R2 coeficiente de determinación; F ANOVA estadístico; coeficiente Beta: coeficiente de regresión estandarizado.

## 6-DISCUSIÓN



Los resultados de este estudio muestran una elevación de los niveles de las variables estudiadas (salvo la TSP1 que muestra una disminución) respecto a los controles sanos, lo que se explicaría por el ambiente proangiogénico e inflamatorio propio de la enfermedad y el estadio avanzado de la misma. No encontramos información de que se haya realizado ningún estudio que analice en su conjunto los marcadores de angiogénesis, coagulación e inflamación que seleccionamos en esta tesis como posibles biomarcadores pronóstico en CPNM avanzado y su relación con la respuesta al tratamiento (quimioterapia+/-bevacizumab). El estudio de Beerepoot et al<sup>153</sup>, encontró un aumento de 3.6 veces más de CECs viables en pacientes con distintos tipos de cáncer en progresión de enfermedad respecto a los sujetos sanos y observaron que estos niveles se modificaban tras la quimioterapia. En nuestro estudio, observamos una asociación entre los niveles basales elevados de las CECs y una peor supervivencia. Por otra parte, tras el tratamiento, no observamos una variación estadísticamente significativa entre los niveles basales y los obtenidos tras el mismo, que se asociara a la respuesta o a la supervivencia, aunque siguen siendo elevados respecto a los controles. Contrariamente, el estudio de Kawaishi et al<sup>155</sup>, encontró una asociación entre los niveles basales elevados de CECs y un mayor intervalo libre de enfermedad y una disminución de sus niveles tras la quimioterapia en aquellos pacientes con respuesta al tratamiento. Por otra parte, estudios realizados en otros tumores como el estudio de Ronzoni et al<sup>204</sup> en pacientes con carcinoma colorrectal tratados con quimioterapia asociada a bevacizumab, mostraron una correlación entre los niveles basales elevados de las CECs y una peor supervivencia y una disminución de sus niveles tras la quimioterapia asociada a la respuesta y a un mayor intervalo libre de enfermedad. Otro estudio en pacientes con carcinoma colorrectal, tratados con quimioterapia asociada a bevacizumab, realizado por Matsusaka et al<sup>205</sup> mostró una asociación entre unos niveles elevados de las CECs y una peor supervivencia.

Con respecto a las EPCs, sólo se realizó el análisis de las mismas en 18 pacientes debido al retraso en la puesta a punto de la técnica, lo que limita las conclusiones de este estudio sobre su posible valor pronóstico y predictivo de respuesta. Se observó que los valores de las mismas tras el tratamiento estaban elevados respecto a los controles ( $p=0,013$ ), y además que sus niveles tras el tratamiento tenían una media más baja en aquellos pacientes que fueron tratados con bevacizumab ( $p=0,01$ ). No se

encontró una asociación con el pronóstico y la respuesta. El estudio de Nowak et al<sup>145</sup> y<sup>206</sup> encontró una correlación entre los niveles de las EPC con el estadio clínico y los niveles del VEGF en pacientes con CPNM. Aunque en nuestro estudio no se observa una variación significativa de los niveles de las EPC y de las CECs antes y después del tratamiento, relacionada con la respuesta al mismo, existe evidencia de esta asociación como ya se comentó. Un estudio realizado por Roodhart et al<sup>207</sup>, midió los niveles de las CECs y EPCs a las 4 horas de la administración de la quimioterapia, así como a los 7 y 21 días del primer ciclo de quimioterapia en 71 pacientes con distintos tipos de cáncer y que recibieron distintos citostáticos como tratamiento. Observaron que la variación de los niveles a los 7 y 21 días tras la quimioterapia se asociaban a la respuesta al tratamiento, no así en los niveles medidos a las 4 horas de la administración del mismo, y que en aquellos pacientes con progresión de enfermedad, los niveles de las CECs a los 7 y 21 días se incrementaban sucesivamente, y éste aumento se correlacionó con la progresión de enfermedad; respecto a las EPC, no se observó una asociación entre sus niveles y la respuesta o el pronóstico.

Con respecto a las MPs, en nuestro estudio se observa una asociación entre los niveles basales elevados de las MPs y una mayor supervivencia global y libre de progresión. Por otra parte, los niveles elevados tras el tratamiento se asociaron a una larga supervivencia (>15 meses). La sensibilidad para detectar largos supervivientes fue de un 88,9% y la especificidad de un 62,5%. No existe bibliografía al respecto en pacientes con CPNM. Un estudio realizado por Guervilly et al<sup>208</sup> en pacientes con síndrome de distrés respiratorio encontró una relación positiva entre unos niveles elevados de micropartículas leucocitarias y la supervivencia. Es conocido que las micropartículas son protrombóticas en diferentes patologías y en pacientes con cáncer, donde se vio una relación con la frecuencia de eventos trombóticos<sup>209-11</sup> y también se ha visto en estudios su valor como predictora de metástasis a distancia<sup>212</sup>. Las micropartículas son vesículas que proceden de las plaquetas, células endoteliales, los leucocitos y las propias células tumorales. Aunque todavía no existe un consenso definido<sup>213</sup> sobre la técnica de medición de las mismas, el comité científico de estandarización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia<sup>214</sup>) ha presentado una primera guía sobre la medición de las micropartículas plaquetarias por citometría de flujo. En nuestro estudio, se realizó una técnica de medición basada en la

discriminación de las mismas por citometría de flujo por su tamaño (<1 uM) y por otra parte de forma indirecta mediante un ensayo de generación endógena de trombina. Es de interés continuar esta línea de investigación buscando una mejor caracterización de las mismas. Más aún, que parecen ser de importancia a la hora de su medición múltiples factores como el tipo de marcador seleccionado para su identificación<sup>215</sup>, las condiciones basales de la muestra<sup>216</sup>, la comorbilidad<sup>217</sup> y el citómetro con el cual se realice su medición<sup>218-9</sup>.

Por otra parte, en este estudio se observa una asociación entre unos niveles basales disminuidos de TSP1 y una peor supervivencia global y libre de progresión, y por otra parte una asociación entre los niveles elevados del VEGF y la progresión de enfermedad. La TSP1 es una potente inhibidora de la angiogénesis<sup>220</sup> y el VEGF es un activador de la angiogénesis. Los resultados de nuestro estudio coinciden con los observados en el estudio de Dudek et al<sup>183</sup>, con la asociación de unos niveles bajos de TSP1 y unos niveles elevados del VEGF y una peor supervivencia en CPNM. Un estudio publicado recientemente por Jantus-Lewintre et al<sup>221</sup>, analizó los niveles del VEGF y del VEGFR2 en pacientes con CPNM y controles para valorar su posible papel como biomarcador pronóstico, encontraron unos niveles elevados tanto del VEGF como del VEGFR2 respecto a los controles, y que un subgrupo de pacientes, (con niveles elevados de VEGF > percentil 75 y niveles bajos del VEGFR2 < percentil 75), presentaban el peor pronóstico.

Se observó una correlación entre el VEGF y las MPs así como el VEGFR2 con el VEGF y entre la GET con las MPs. El estado proangiogénico y trombótico de la propia enfermedad explicaría estas correlaciones. Por otra parte, es llamativo que en este estudio sólo se observaron fenómenos trombóticos en 2 pacientes, a pesar de los niveles elevados de MPs, FT y GET.

En cuanto al tratamiento con bevacizumab, se observa una mejor supervivencia para los pacientes tratados con el mismo respecto a los pacientes con estadio IV tratados con quimioterapia sólo (16 vs 7 meses)  $p=0,03$  de acuerdo con los estudios conocidos<sup>133-4</sup>. Por otra parte, el análisis multivariante muestra una influencia del bevacizumab sobre las variables CECs, EPCs, TSP1, VEGF, sVEGF1 y GET, lo cual parece indicar que la movilización de los marcadores es diferente según el tratamiento administrado. Es importante destacar que en nuestro estudio sólo 12 pacientes

recibieron bevacizumab, lo que limita nuestras conclusiones sobre el posible valor pronóstico y predictor de respuesta de las variables estudiadas para este subgrupo de pacientes. Sería muy interesante continuar esta línea de investigación sobre cómo se movilizan las variables según el momento de su medición, el tipo de tratamiento, y cómo influye la comorbilidad sobre las mismas.

## **7. CONCLUSIONES**

1- Nuestros resultados muestran que los niveles basales de las variables estudiadas están elevadas respecto a los controles sanos.

2- Los niveles basales elevados de las CECs, de las MPs, así como del VEGF y disminuídos de la TSP1 tienen una relación con el pronóstico y podrían ser de utilidad como marcadores pronóstico y de respuesta al tratamiento en pacientes con CPNM avanzado.

3- Los niveles elevados de las MPs, se asociaron a buen pronóstico tanto en su medición basal como tras el tratamiento. Este es el primer estudio que muestra una relación entre los niveles elevados de las MPs con un buen pronóstico en CPNM avanzado.

4- El tipo de tratamiento administrado (quimioterapia o quimioterapia asociada a bevacizumab) afectó de forma diferente a la supervivencia en los pacientes con estadio IV y a los niveles de las variables: observamos una influencia del bevacizumab sobre los niveles de los marcadores estudiados.

5- El CPNM es una enfermedad prevalente y grave, y la investigación es prioritaria para mejorar su mortalidad. Es importante, entender mejor el mecanismo de angiogénesis tumoral para poder optimizar la administración de los tratamientos antiangiogénicos y así conseguir una mejoría en la supervivencia de los pacientes que lo reciban.



## **8-BIBLIOGRAFÍA**



- 1- Martínez Hernández, J."Principales neoplasias: Pulmón, mama, cérvix, colon, estómago, próstata, leucemias, linfomas y epitelomas. Epidemiología, factores de riesgo y prevención". En: Nociones de salud pública. Díaz de Santos.2003 [ISBN 8479785624](#).
- 2- World Health Statistics 2007; 24-36. ISBN 978 92 4 068211 5. Disponible en: <http://www.who.int/whosis/whostat2007.pdf>.
- 3- El cáncer de pulmón en cifras. En: .Asociación Española Contra el Cáncer (ed.): 2007. Disponible en: <http://www.todocancer.com>.
- 4- Defunciones según la causa de muerte en España, 2005. Instituto Nacional de Estadística. Madrid, 2008. Disponible en: <http://www.ine.es>.
- 5- Hecht S. Etiology of Cancer: Tobacco. In De Vita, Hellman and Rosenberg's Cancer: principles & practice of oncology. 8ª Edición. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008: 147-155.
- 6- [Wild P](#), [Bourgkard E](#), [Paris C](#). Lung cancer and exposure to metals: the epidemiological evidence. [Methods Mol Biol](#). 2009; 472:139-67.
- 7- Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2--the affair that never ends- Carcinogenesis. 2002; 4:541-7.
- 8- Hainaut P, Olivier M, Pfeifer GP: TP53 mutation spectrum in lung cancers and mutagenic signature of components of tobacco smoke: Lessons from the IARC TP53 mutation database. *Mutagenesis* 2001; 16:551-553.
- 9- [Pfeifer GP](#), [Denissenko MF](#), [Olivier M](#), et al. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. [Oncogene](#) 2002; 48:7435-51.
- 10- [Ciardiello F](#), [Tortora G](#). EGFR antagonists in cancer treatment. [N Engl J Med](#). 2008; 11:1160-74.
- 11- [Gazdar AF](#). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. [Oncogene](#) 2009:S24-31.
- 12- Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y et al. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 190- 8.
- 13- Zhang X, Chang A. [Molecular predictors of EGFR-TKI sensitivity in advanced non-small cell lung cancer](#). *Int J Med Sci*. 2008; 4:209-17.
- 14- [Sung HJ](#), [Cho JY](#). Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. [BMB Rep](#). 2008; 9:615-25.
- 15- Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, et al. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 1988; 48:5738-41.
- 16- Mascaux C, Iannino N, Martin B, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with metaanalysis. *Br J Cancer* 2005; 92:131-39.
- 17- Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, et al. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer* 2006; 8:30-38.
- 18- [Pallis A](#), [Briasoulis E](#), [Linardou H](#), et al. Mechanisms of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Clinical and Molecular Considerations. [Curr Med Chem](#). 2011 [Epub ahead of print].
- 19- Rosell R, Moran T, Queralt C, et al: Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009; 361:1018-20.
- 20- Suzuki M, Shigematsu H, Lizasa T, et al: Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2006; 106:2200-07.
- 21- Finberg KE, Sequist LV, Joshi VA, et al: Mucinous differentiation correlates with absence of EGFR mutation and presence of KRAS mutation in lung adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *J Mol Diagn* 2007; 9:320-326.

- 22- Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:1693-703.
- 23- Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448:561-6.
- 24- [Cobo M](#), [Isla D](#), [Massuti B](#) Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 19:2747-54.
- 25- [Olaussen KA](#), [Dunant A](#), [Fouret P](#), et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006; 10:983-91.
- 26- Davidson JD, Ma L, Flagella M, et al. An increase in the expression of ribonucleotide reductase subunit 1 large subunit 1 is associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res*. 2004; 64: 3761-66.
- 27- Bepler G., Kusmartseva I., Sharma S., et al. RRM1-modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small cell lung cancer. *J.Clin. Oncol*. 2006; 24: 4731-37.
- 28- Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, et al. A. Spanish Lung Cancer Group. Ribonucleotide reductase subunit 1 mRNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res*. 2004; 10: 1318-1325.
- 29- Urano N., Fujiwara Y., Doki Y., et al. Clinical significance of class III  $\beta$ -tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer. *Int. J. Oncol*. 200 ; 28: 375-378.
- 30- Sève P., Isaac S., Trédan O, et al. Expression of class III  $\beta$ -tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 5481-5486.
- 31- Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum. Mol. Genet*. 2004; 20: 2443-9.
- 32- [Ozasa H](#), [Oguri T](#), [Uemura T](#) et al. Significance of thymidylate synthase for resistance to pemetrexed in lung cancer *Cancer Sci*. 2010; 1:161-6.
- 33- Schettino C, Bareschino M, Maione P, et al. The Potential Role of Pharmacogenomic and Genomic in the Adjuvant Treatment of Early Stage Non Small Cell Lung Cancer. *Current Genomics* 2008; 9: 252-262.
- 34- [Simon G](#), [Sharma A](#), [Li X](#), [Hazelton T](#) et al. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 19:2741-6.
- 35- Ries L, Eisner M, Kosary C, et al. Cancer statistics review, 1975-2002. Bethesda. National Cancer Institute 2005. Disponible en: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/index.html](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/index.html).
- 36- Brambilla E, Travis WD, Colby TD, et al. Histologic Typing of lung and pleural tumors. The World Health Organization (WHO) Classification of Lung Cancer 1999. *Eur Respir J* 2001; 18: 1059-68.
- 37- Folpe AL, Gown AM et al. [Thyroid transcription factor-1: immunohistochemical evaluation in pulmonary neuroendocrine tumors](#). *Mod Pathol*. 1999; 1:5-8.
- 38- Schrupp D, Giaccone G, Kelsey, et al. Non-Small-Cell- Lung Cancer. In De Vita, Hellman and Rosenberg's Cancer: principles & practice of oncology. 8ª Edición. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008: 900-09.
- 39- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. [Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib](#). *N Engl J Med*. 2004; 21: 2129-39.

- 40- [Noguchi M](#), [Morikawa A](#), [Kawasaki M](#). Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. [Cancer](#). 1995;12:2844-52
- 41- Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, et al: World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France, IARC Press, 2004.
- 42- Lyda MH, Weiss LM: Immunoreactivity for epithelial and neuroendocrine antibodies are useful in the differential diagnosis of lung carcinomas. [Hum Pathol](#)2000; 31:980-87.
- 43- Sturm N, Lantuejoul S, Laverriere MH, et al: Thyroid transcription factor 1 and cytokeratins 1, 5, 10, 14 (34betaE12) expression in basaloid and largecell neuroendocrine carcinomas of the lung. [Hum. Pathol](#) 2001; 32:918-25.
- 44- Ginsberg MS, Grewal RK, Heelan RT: Lung cancer. [Radiol Clin North Am](#) 2007; 45:21-43.
- 45- Beasley MB, Brambilla E, Travis WD: The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. [Semin Roentgenol](#) 2005; 40:90-97.
- 46- Zamecnik J, Kodet R: Value of thyroid transcription factor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: A study of 109 cases. [Virchows Arch](#) 2002; 440:353-361.
- 47- Tomaszefski JF, Connors AF, Rosenthal ES, et al: Peripheral vs. central squamous cell carcinoma of the lung: A comparison of clinical features, histopathology, and survival. [Arch Pathol Lab Med](#) 1990; 114: 468-474.
- 48- Au N, Cheang M, Huntsman DG, et al. Evaluation of immunohistochemical markers in nonsmall cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: A tissue microarray study of 284 cases and 18 markers. [J Pathol](#) 2009; 204:101-09.
- 49- Mountain CF: Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. [Chest](#) 1997; 111 : 1710-17.
- 50- Lung. In: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 6th Ed. New York: Springer, 2002: 167-181.
- 51- Rami Porta R. Nueva clasificación TNM del cáncer de pulmón. [Arch Bronconeumol](#). 2009; 45:159–161.
- 52- Manchon P, Borràs J, Ferro T, Espinàs J. Lung Cancer OncoGuia. [Clin Transl Oncol](#) 2008; 11:805-824.
- 53- Finkelstein SE, Summers RM, Nguyen DM et al. Virtual bronchoscopy for evaluation of malignant tumors of the thorax. [J Thorac Cardiovasc Surg](#) 2002; 123: 967.
- 54- [Finkelstein SE](#), [Schrump DS](#), [Nguyen DM](#), et al. Comparative evaluation of super high-resolution CT scan and virtual bronchoscopy for the detection of tracheobronchial malignancies. [Chest](#). 2003; 124:1834-40.
- 55- Reed CE, Harpole DH, Posther KE et al. Results of the American College of surgeons oncology group. Z0050 trial: the utility of positron emission tomography in staging potentially operable non smallcell lung cancer. [J Thoracic Cardiovasc Surg](#) 2003; 126: 1943.
- 56- Mehta AC, Kathawalla S, Chan C, Arroliga A. Role of bronchoscopy in the evaluation of solitary pulmonary nodule. [J Bronchol](#) 1995; 2: 315-22.
- 57- Shure D. Transbronchial biopsy and needle aspiration. [Chest](#) 1989; 95: 1130-8.
- 58- Holty JE, Kuschner WG, Gould MK. Accuracy of transbronchial needle aspiration for mediastinal staging of non-small cell lung cancer: a meta-analysis. [Thorax](#) 2005; 60:949–955.
- 59- [Gomez M](#), [Silvestri GA](#). Endobronchial ultrasound for the diagnosis and staging of lung cancer. [Proc Am Thorac Soc](#). 2009 Apr 15; 6:180-6.
- 60- [Collins LG](#), [Haines C](#), [Perkel R](#) et al. Lung cancer: diagnosis and management. [Am Fam Physician](#). 2007; 75:56-63.
- 61- Yasufuku K, Fujisawa T. Staging and diagnosis of non-small cell lung cancer: invasive modalities. [Respirology](#) 2007; 12: 173–83.

- 62- [Noguchi M](#), [Morikawa A](#), [Kawasaki M](#), et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. [Cancer](#) 1995; 75:2844-52
- 63- Karnofsky DA, Burchenal JH. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In Macleod CM (ed.): Evaluation of Chemotherapeutic Agents. New York, NY: Columbia University Press 1949; 199–205.
- 64- Oken MM, Creech RH, Tormey DC et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. [Am J Clin Oncol](#) 1982; 5: 649– 55.
- 65- [Gridelli C](#), [Ardizzoni A](#), [Le Chevalier T](#), et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer patients with ECOG performance status 2: results of an European Experts Panel. [Ann Oncol](#). 2004; 15:419-26.
- 66- Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. [N Engl J Med](#) 2004; 350:379-92.
- 67- Hammerschmidt S, Wirtz H. Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. [Dtsch Arztebl Int](#) 2009; 106: 809–20.
- 68- [Lung Cancer OncoGuia Group](#), [Manchon Walsh P](#), [Manchon P](#), [Borràs JM](#), et al. Lung Cancer OncoGuia. [Clin Transl Oncol](#). 2009; 11:805-24.
- 69- Goldstraw P, Crowley JJ et al. The IATSL 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 Thoracic Oncol](#) 2007; 2:705-714.
- 70- [Roth JA](#), [Fossella F](#), [Komaki R](#), et al. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy with surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. [J Natl Cancer Inst](#). 1994; 86:673-80.
- 71- Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, et al. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non small cell lung cancer. [N Engl J Med](#) 1994; 330:153-158.
- 72- Depierre A, Milleron B, et al. 5-years results of the French randomized study comparing preoperative chemotherapy followed by surgery and primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIA non small cell lung cancer. [Lung Cancer](#) 2003; 41: S 62.
- 73- Lim E, Harris G, Patel A, et al. Preoperative versus postoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: Systematic review and indirect comparison meta-analysis of randomized trials. [J Clin Oncol](#) 2008; 26:7546.
- 74- Felip E, Massuti B, Alonso G, et al. Surgery (S) alone, preoperative (preop) paclitaxel/carboplatin (PC) chemotherapy followed by S, or S followed by adjuvant (adj) PC chemotherapy in early-stage non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of the NATCH multicenter, randomized phase III trial. [J Clin Oncol](#) 2009; 27: abstr 7500.
- 75- Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non small cell lung cancer: A meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. [BMJ](#) 1995; 311:899–909.
- 76- Arriagada R, Bergman B, Dunant A et al. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. [N Engl J Med](#) 2004; 350:351–360.
- 77- Winton T, Livingston R, Johnson D et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. [N Engl J Med](#) 2005; 352:2589–97.
- 78- Douillard JY, Rosell R, De Lena M et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): A randomised controlled trial. [Lancet Oncol](#) 2006; 7:719–727.
- 79- Arriagada R, Dunant A, Pignon JP et al. Long-term results of the International Adjuvant Lung Cancer Trial evaluating adjuvant cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. [J Clin Oncol](#) 2010; 28:35– 42.

- 80- Butts CA, Ding K, Seymour L et al. Randomized phase III trial of vinorelbine plus cisplatin compared with observation in completely resected stage IB and II non-small cell lung cancer: Updated survival analysis of JBR.10. *J Clin Oncol* 2010; 28:29–34.
- 81- Douillard JY, Rosell R, De Lena M et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): A randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 719–727.
- 82- Pignon J, Tribodet H, Scagliotti G, et al. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group *J Clin Oncol* 2008; 26:3552-3559.
- 83- [Douillard JY](#), [Rosell R](#), [De Lena M](#), et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. [Lancet Oncol](#). 2006:719-27.
- 84- Arriagada R, Auperin A, Burdett S, et al. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet* 2010; 375: 1267–77.
- 85- Pisters KMW, Evans WK, Azzoli CG, et al. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non-small cell lung cancer guideline. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5506–18.
- 86- [Sangha R](#), [Price J](#), [Butts CA](#). et al. Adjuvant therapy in non-small cell lung cancer: current and future directions. [Oncologist](#). 2010; 15:862-72. .
- 87- Van Meerbeeck J, Pisters K. Preoperative Chemotherapy for early stage non-small-cell lung cancer. En *Principles & practice of lung cancer*. Pass H, Carbone D, Johnson D. Lippincott Williams & Wilkins. Filadelfia:2010; 54:791-798
- 88- PORT Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy in nonsmall-cell lung cancer: Systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. *Lancet* 1998; 352: 257–263.
- 89- PORT Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 2: CD002142.
- 90- Lally BE, Zelterman D, Colasanto JM et al. Postoperative radiotherapy for stage II or III non-small-cell lung cancer using the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *J Clin Oncol* 2006; 24:2998–3006.
- 91- D’Addario G and Felip E. Non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2008; 19: 39–40.
- 92- Le Péchoux C, Dunant A, Pignon JP et al. Need for a new trial to evaluate adjuvant postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer patients with N2 mediastinal involvement. *J Clin Oncol* 2007; 25:10–11.
- 93- Fleck J, Camargo J et al. Chemoradiation therapy vs chemotherapy alone as a neoadjuvant treatment for stage III nonsmall cell lung cancer. *Prom Am Soc Clin Oncol* 1994; 12:333.
- 94- Jett JR, Schild SE, Keith RL, et al. American College of chest physicians. Treatment of non-small cell lung cancer, stage IIIB: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132:S266-S276.
- 95- Blanke C, Ansari R, Mantravadi R, et al. Phase III trial of thoracic irradiation with or without cisplatin for locally advanced unresectable non-small-cell lung cancer: a Hoosier Oncology group protocol. *J Clin Oncol* 1995; 13:1425-1429.
- 96- Cakir S, Egehan I. A randomised clinical trial of radiotherapy plus cisplatin versus radiotherapy alone in stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 43:309-316.
- 97- Schaake-Koning C, Van den Bogaert W, Dalesio O, et al. Effects of concomitant cisplatin and radiotherapy alone in stage III non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 1992; 326:524-530.

- 98- Trovó MG, Minatel E, Franchin G, et al. Radiotherapy versus radiotherapy enhanced by cisplatin in stage III non small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24:11-15.
- 99- Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, et al. Cisplatin versus carboplatin-based chemotherapy in the first-line treatment of advanced non- small cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 847-857.
- 100- Furuse K, Fukuola M, Kawahara M et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine and cisplatin in unresectable stage III non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:2692-2699.
- 101- Curran W, Scott C, Langer C. Long term benefit is observed in a phase III comparison of sequential vs concurrent chemoradiation for patients unresectable stage III NSCLC. RTOG 9410. *J Clin Oncol* 2003; 22:2499.
- 102- Huber RM, Flentje M, Schmidt M, et al. Simultaneous chemoradiotherapy compared with radiotherapy alone after induction chemotherapy in inoperable stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer: study CTRT99/97 by the Bronchial Carcinoma Therapy Group. *J Clin Oncol* 2006; 24:4397-4404.
- 103- Fournel P, Robinet G, Thomas P et al. Randomized phase III trial of sequential chemoradiotherapy compared with concurrent chemoradiotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer: Groupe Lyon-Saint-Etienne d'OncoLogie Thoracique-Groupe Francais de Pneumo-Cancerologie NPC 95-01 Study. *J Clin Oncol* 2005; 23:5910-5917.
- 104- Hanna NH, Neubauer M, Ansari R, et al. Phase III trial of cisplatin plus etoposide concurrent chest radiation with or without consolidation docetaxel in patients with inoperable stage III non small cell lung cancer: HOG 01-24/USO-023. *J Clin Oncol* 2007; 25:7512.
- 105- Vokes EE, Herndon JE II, Crawford J, et al. Randomized phase II study of cisplatin with gemcitabine or paclitaxel or vinorelbine as induction chemotherapy followed by concomitant chemoradiotherapy for stage IIIB non-small-cell lung cancer: cancer and leukemia group B study 9431. *J Clin Oncol* 2002; 20:4191-4198.
- 106- Fournel P, Vernengo A, Robinet G, et al. Induction or consolidation chemotherapy with cisplatin and paclitaxel plus concurrent chemoradiation with carboplatin and vinorelbine for unresectable non-small-cell lung cancer patients: randomized phase II trial GFPC-GLOT-IFCT 02-01. *J Clin Oncol* 2006; 24:7048.
- 107- Vokes EE, Herndon JE II, Kelley MJ, et al. Induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy compared with chemoradiotherapy alone for regionally advanced unresectable stage III Non small cell lung cancer: Cancer and Leukemia group B. *J Clin Oncol* 2007; 25:1698-1704.
- 108- Bunn P, Thatcher N. Systemic treatment for advanced (stage IIIb/IV) non-small-cell lung cancer: more treatment options, more things to consider. *Conclusion. Oncologist* 2008; 13:37-46.
- 109- Schiller J, Harrington D, Belani C, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 92-8.
- 110- Le Chevalier T, Scagliotti G, Natale R, et al. Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer: A metaanalysis of survival outcomes. *Lung Cancer* 2005; 47:69-80.
- 111- Jiang J, Liang X, Zhou X, et al. A meta-analysis of randomized controlled trials comparing carboplatin-based to cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 57:348-358.

- 112- Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, et al. Cisplatin versus carboplatin based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: An individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 847–57.
- 113- Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-smallcell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:3543–51
- 114- Scagliotti G, Hanna N, Fossella F, et al. The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two Phase III studies. *Oncologist* 2009; 14: 253–63.
- 115- [Shepherd FA](#), [Rodrigues Pereira J](#), [Ciuleanu T](#), et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353:123-32.
- 116- [Mok TS](#), [Wu YL](#), [Thongprasert S](#), et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009; 361: 947-57.
- 117- Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-smallcell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:3543–51
- 118- Rossi A, Maione P, Bareschino MA, et al. The Emerging Role of Histology in the Choice of First-Line Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Implication in the Clinical Decision-Making. *Curr Med Chem* 2010 Feb 16. [Epub ahead of print]
- 119- [Neal JW](#). Histology matters: individualizing treatment in non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2010; 15:3-5.
- 120- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitorcells. *EMBO J* 1999; 18:3964–72.
- 121- Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7: 1194–201.
- 122- Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, et al. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 2006; 313:1785–7.
- 123- Döme B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularisation mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*. 2007; 170:1-15.
- 124- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008; 358:2039-49.
- 125- Sullivan L, Brekken R. et al. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *Landes Bioscience* 2010: 165-175.
- 126- Angelo L, Kurzrock R. Vascular endothelial Growth Factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2825-2830.
- 127- Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1995; 36:127-37.
- 128- [Gridelli C](#), Maione P, [Rossi A](#), et al. The role of bevacizumab in the treatment of non-small cell lung cancer: current indications and future developments. *Oncologist*. 2007:1183-93.
- 129- Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther*. 2006; 28:1779-802.
- 130- [William WN](#), [Kies MS](#), [Fossella FV](#), et al. Phase 2 study of carboplatin, docetaxel, and bevacizumab as frontline treatment for advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2010 Mar 11. [Epub ahead of print]
- 131- Dalsania CJ, Hageboutros A, Harris E et al. Phase II trial of bevacizumab plus pemetrexed and carboplatin in previously untreated advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007:18163.
- 132- Herbst R, O’Neill V, Fehrenbacher L, et al. Phase II Study of Efficacy and Safety of Bevacizumab in Combination With Chemotherapy or Erlotinib Compared With

- Chemotherapy Alone for Treatment of Recurrent or refractory Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2007 25: 4743-50.
- 133- Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:2542-50.
- 134- [Reck M](#), [von Pawel J](#), [Zatloukal P](#), et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J Clin Oncol*. 2009; 27:1227-34.
- 135- Hiadovec et al. *Thromb Res* 1973;3:665-74.
- 136- [Blann AD](#), [Woywodt A](#), [Bertolini F](#), et al. [Dignat-George F](#). Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*. 2005; 93:228-35.
- 137- [Bertolini F](#), [Shaked Y](#), [Mancuso P](#), et al. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:835-45.
- 138- Woywodt A, Blann A, Kirsch T, et al. Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost* 2006; 4:671-677.
- 139- Steurer M, Kern J, Zitt M, et al. Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. *BMC Research Notes* 2008, 1:71.
- 140- Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J. Validation of a Standardized Method for Enumerating Circulating Endothelial Cells and Progenitors: Flow Cytometry and Molecular and Ultrastructural Analyses. *Clin Cancer Res* 2009; 15:267-73.
- 141- Boos CJ, Lip GY Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1538-47.
- 142- Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, et al. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*. 2001; 97:3658-61.
- 143- Goon PK, Lip GY, Boos CJ, et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia* 2006; 8:79-88.
- 144- Quirici N, Soligo D, Caneva L, et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 2001; 115:186-194.
- 145- Nowak K, Rafat N, Belle S, et al. Circulating endothelial progenitor cells are increased in human lung cancer and correlate with stage of disease. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010; 37:758-63.
- 146- Wickersheim A, Kerber M, de Miguel LS, et al. Endothelial progenitor cells do not contribute to tumor endothelium in primary and metastatic tumors *Int J Cancer* 2009; 125: 1771-77.
- 147- Mancuso P and Bertolini F. Circulating endothelial cells as biomarkers in clinical oncology. *Microvasc Res*. 2010; 79:224-8.
- 148- Seandel M, Butler J, Lynder D, et al. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell* 2008; 13: 181-3.
- 149- Nolan DJ, Ciarrochi A, Mellick AS, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Gene Dev* 2007; 21: 1546-58.
- 150- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, et al. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008; 319: 195-8.
- 151- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438:820-7

- 152- Stoellting S, Trefzer T, Kisro J. Low-dose oral metronomic chemotherapy prevents mobilization of endothelial progenitor cells into the blood of cancer patients. *In Vivo* 2008; 22:831-6
- 153- Beerepoot LV, Mehra N, Vermaat JS, et al. Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann Oncol.* 2004; 15:139-45.
- 154- Naik RP, Jin D, Chuang E, et al. Circulating endothelial progenitor cells correlate to stage in patients with invasive breast cancer. [Breast Cancer Res Treat.](#) 2008; 107:133-8.
- 155- Kawaishi M, Fujiwara Y, Fukui T. Circulating Endothelial Cells in Non-small Cell Lung Cancer Patients Treated with Carboplatin and Paclitaxel. *J Thorac Oncol.* 2009; 4:208-13.
- 156- Dome B, Timar J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2006; 66:7341-7.
- 157- Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57:965-9.
- 158- Vroiling L, Lind JS, de Haas RR, et al. CD133 circulating haematopoietic progenitor cells predict for response to sorafenib plus erlotinib in non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer.* 2010; 102:268-75.
- 159- Wang J, Huang C, Wei Xi-Yin, et al. Changes of activated circulating endothelial cells and survivin in patients with non-small cell lung cancer after antiangiogenesis therapy. *Chin Med J* 2008; 121: 2234-40.
- 160- Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996; 81: 1–41.
- 161- Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, et al. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 392–401.
- 162- Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2561–2568.
- 163- Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, et al. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004; 104: 3190–3197.
- 164- Tesse A, Martínez MC, Meziani F, et al. Origin and biological significance of shed-membrane microparticles. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006;6: 287-94.
- 165- Morel O, Morel N, Freyssinet JM, et al. Platelet microparticles and vascular cells interactions: A checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 2008; 19: 9-23.
- 166- Periard D, Boulanger CM, Eyer S, et al. Are circulating endothelial-derived and platelet-derived microparticles a pathogenic factor in the cisplatin-induced stroke? *Stroke.* 2007 May; 38:1636-8.
- 167- Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, et al. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 520-7
- 168- Goon PK, Lip GY, Boos CJ et al. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia* 2006; 8:79-88.
- 169- Meziani, F, Tesse A, et al. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacological reports,* 2008, 60:75-84

- 170- [Bidot L](#), [Jy W](#), [Bidot C](#), et al. Microparticle-mediated thrombin generation assay: increased activity in patients with recurrent thrombosis. [J Thromb Haemost](#). 2008; 6:913-9.
- 171- [Debaugnies F](#), [Azerad MA](#), [Noubouossié D](#), et al. Evaluation of the procoagulant activity in the plasma of cancer patients using a thrombin generation assay. [Thromb Res](#). 2010 Dec; 126:531-5.
- 172- Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. [Semin Thromb Hemost](#). 2007; 33:771-9.
- 173- Kopczyńska E, Danciewicz M, Kowalewski J, et al. T.The estimation of serum concentration of vascular endothelial growth factor in patients with non-small cell lung cancer] [Pol Merkur Lekarski](#). 2007; 22:536-8.
- 174- Shimanuki Y, Takahashi K, Cui R, et al. Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer. [Lung](#). 2005; 183:29-42.
- 175- Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, et al. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients: [Respir Med](#). 2004; 98:632-6.
- 176- Laack E, Köhler A, Kugler C, Dierlamm T, et al. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. [Ann Oncol](#). 2002; 13:1550-7.
- 177- Yilmaz A, Ernam D, Unsal E, et al. Vascular endothelial growth factor immunostaining correlates with postoperative relapse and survival in non-small cell lung cancer. [Arch Med Res](#). 2007; 38:764-8.
- 178- Yilmaztepe A, Ulukaya E, Zik B, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) is decreased in lung cancer patients showing progression: a pilot study. [Cancer Invest](#). 2007 ; 25:322-7.
- 179- Decaussin M, Sartelet H, Robert C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. [J Pathol](#). 1999; 188:369-77.
- 180- Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, et al. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. [Proc Natl Acad Sci USA](#) 2001; 98:12485–12490.
- 181- Gupta K, Gupta P, Wild R, Ramakrishnan S, Hebbel RP. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. [Angiogenesis](#) 1999; 3: 147–158.
- 182- Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. [J Biol Chem](#) 2000; 275:32167–32173.
- 183- Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. [Nat Med](#) 2002; 8:349–357.
- 184- Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. [Nat Med](#) 2000; 6:41–48.
- 185- Nor JE, Mitra RS, Sutorik MM, et al. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. [J Vasc Res](#) 2000; 37:209–218.

- 186- Dudek AZ, Mahaseth H. Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival. *Cancer Invest.* 2005; 23:193-200.
- 187- Mascaux C, Martin B, Paesmans M, et al. Expression of thrombospondin in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2002; 22:1273-7.
- 188- Yamaguchi M, Sugio K, et al. Reduced expression of thrombospondin-1 correlates with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2002; 36: 143-50.
- 189- Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1015–22.
- 190- Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004; 103:4545–53.
- 191- Haubold K; RinkM; SpathB, et al. Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with early-stage prostate cancer. *Thromb Haemost* 2009; 101:1147–1155.
- 192- Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34:392–401.
- 193- Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2007; 97:119–23.
- 194- Caine GJ, Lip GY, Blann AD. Platelet-derived VEGF, Flt-1, angiopoietin-1 and P-selectin in breast and prostate cancer: further evidence for a role of platelets in tumour angiogenesis. *Ann Med* 2004; 36:273–7.
- 195- Tilleyr, HolscherT, Belani R, et al. Tissue Factor Activity is Increased in a Combined Platelet and Microparticle Sample from Cancer Patients. *Thromb Res.* 2008; 122: 604–609.
- 196- Huang W, Yeh H, Lin Ch. Et al. Signal transducer and activator of transcription3 activation up-regulates interleukin-6 autocrine production: a biochemical and genetic study of established cancer cell lines and clinical isolated human cancer cells. *Molecular Cancer* 2010; 9:309
- 197- Dendorfer U, Oettgen P, Libermann TA: Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 1994; 14:4443-4454.
- 198- Franchimont N, Rydzial S, Canalis E: Interleukin 6 is autoregulated by transcriptional mechanisms in cultures of rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1997 ; 100:1797-1803.
- 199- [Seike T](#), [Fujita K](#), [Yamakawa Y](#), et al. Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. [Clin Exp Metastasis](#) 2011; 28:13-25.
- 200- [Angelo LS](#), [Kurzrock R](#). Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. [Clin Cancer Res.](#) 2007; 13:2825-30.
- 201- [Yao Z](#), [Fenoglio S](#), [Gao DC](#), et al. TGF-beta IL6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. [Proc Natl Acad Sci U S A.](#) 2010; 107:15535-40.
- 202- [De Vita F](#), [Orditura M](#), [Auremma A](#), et al. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in advanced non small cell lung cancer patients. [J Exp Clin Cancer Res.](#) 1998; 17:413-7.
- 203- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (RECIST Guidelines). *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:205–16.

- 204- [Ronzoni M](#), [Manzoni M](#), [Mariucci S](#), Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as predictive markers of clinical response to bevacizumab-based first-line treatment in advanced colorectal cancer patients. [Ann Oncol](#). 2010; 21:2382-9.
- 205- [Matsusaka S](#), [Suenaga M](#), [Mishima Y](#), et al. Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. [Cancer Chemother Pharmacol](#). 2010 Dec 18. [Epub ahead of print]
- 206- Hohenberger P, Nowak K, Rafat S, et al. The level of circulating endothelial progenitor cells is increased in human lung cancer patients and correlates with the progression of the disease. *J Clin Oncol* 2008;26: Abstr 22055.
- 207- [Roodhart JM](#), [Langenberg MH](#), [Vermaat JS](#), Late release of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients. [Neoplasia](#) 2010; 12:87-94.
- 208- [Guervilly C](#), [Lacroix R](#), [Forel JM](#), et al. High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome. [Crit Care](#). 2011; 15:R31. [Epub ahead of print]
- 209- [Tesselaar ME](#), [Romijn FP](#), [Van Der Linden IK](#), et al. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? [J Thromb Haemost](#). 2007; 5:520-7.
- 210- [Ay C](#), [Freyssinet JM](#), [Sailer T](#), et al. Circulating procoagulant microparticles in patients with venous thromboembolism. [Thromb Res](#). 2009; 123:724-6.
- 211- [Sartori MT](#), [Della Puppa A](#), [Ballin A](#), et al. Prothrombotic state in glioblastoma multiforme: an evaluation of the procoagulant activity of circulating microparticles. [J Neurooncol](#) 2010 Nov 23. [Epub ahead of print].
- 212- Kim H, Song K, Park Y, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *European Journal of Cancer* 2003; 39: 184–191.
- 213- [Shet AS](#). Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. [Vasc Health Risk Manag](#). 2008; 4:769-74.
- 214- Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 2009; 7:190–7.
- 215- [Dignat-George F](#), [Boulangier CM](#). The many faces of endothelial microparticles. [Arterioscler Thromb Vasc Biol](#). 2011; 31:27-33.
- 216- [Dey-Hazra E](#), [Hertel B](#), [Kirsch T](#), et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. [Vasc Health Risk Manag](#) 2010; 6:1125-33.
- 217- [Sinning JM](#), [Losch J](#), [Walenta K](#), et al. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. [Eur Heart J](#). 2010; Dec 24. [Epub ahead of print]
- 218- Siljander P. Platelet-derived microparticles – an updated perspective. *Thrombosis Research* 2011; 127: S30–S33.
- 219- [Kim JS](#), [Ligler FS](#). Utilization of microparticles in next-generation assays for microflow cytometers. [Anal Bioanal Chem](#) 2010; 398:2373-82.
- 220- Armstrong L. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biology* 2003; 22:63-71.
- 221- [Jantus-Lewintre E](#), [Sanmartín E](#), [Sirera R](#), et al. Combined VEGF-A and VEGFR-2 concentrations in plasma: Diagnostic and prognostic implications in patients with advanced NSCLC. [Lung Cancer](#) 2011; Apr 7. [Epub ahead of print]





## 9-APÉNDICE



Anexo 1

Recogida de datos: **ESTUDIO DE CELULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, CELULAS ENDOTELIALES PROGENITORAS, MICROPARTICULAS CIRCULANTES Y MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR NO MICROCITICO**

**Primera visita**

Codigo de paciente Nro	
Fecha	
Fecha de consentimiento informado	
Fecha de nacimiento	

Antecedentes personales:

(sí= 1/ no= 2)

Fumador:

Años/ paquete:

Exfumador desde hace:

Si=1 No = 2	Fecha de diagnóstico	Sigue controles si/no	Fecha del ultimo evento
Cardiopatía isquémica			
Diabetes Mellitus			
Trombosis venosa profunda			
Lupus eritematoso sistémico			
Vasculopatía			
Anemia de células falciformes			
Hipertensión arterial			

Otros antecedentes:

-Quirúrgicos: (intervención, diagnóstico y fecha)

-Alergias medicamentosas:

-Tratamiento habitual:

- ECG basal, fecha e informe:

**Anexo 1 Exploración física:**

Peso                      Talla                      Superficie corporal                      TA                      PS

Exploración Normal	Exploración anormal ( describir)
Fecha de diagnóstico	Técnica utilizada Broncoscopia, otra técnica- Fecha
Descripción del diagnóstico histológico	

**Toxicidad Basal**

Leucocitos	
Neutrófilos	
Hemoglobina	
Hematocrito	
plaquetas	
Creatinina	
Urea	
Na+/ K+	
Bilirrubina	
GOT/GPT	
D- dímeros	n/a
I Quick	n/a

Toxicidad basal	Grado OMS
nauseas	
anorexia	
astenia	
neurológica	
cutánea	
otra	

**Estudio de extensión**

Estadio clínico T N M

Localización de las metástasis:

Lesiones diana

Localización	Tamaño en 2 dimensiones	Método ( TAC, otro)	Fecha

Lesiones no diana

Localización	Presente si=1 no=2	Método	Fecha

El paciente requiere completar estudio de extensión que se solicita para próxima visita si no

Se pide: TAC..... PET ..... Hemograma..... Bioquímica .....

Acepta participar en el estudio y firma consentimiento informado	si	no	No cumple criterios
--	----	----	---------------------

Tratamiento propuesto		
Próxima visita fecha		
Pasa a hospital de día	si	no

**Anexo 2: ESTUDIO DE CELULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, CELULAS ENDOTELIALES PROGENITORAS, MICROPARTICULAS CIRCULANTES Y MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR NO MICROCITICO**

Hoja recogida de datos hospital de día

**Código del paciente**

<b>Fecha</b>		
<b>QT ciclo Nro</b>		
<b>Espontáneo ( si=1/ no=2)</b>		
<b>Radioterapia</b>	<b>Fecha inicio</b>	
	<b>Fecha de fin</b>	

Motivo de consulta:

Tratamiento actual:

Datos de la exploración:

TA    FC    Tº            PS

Exploración Normal	Exploración anormal ( describir)
--------------------	----------------------------------

Datos de laboratorio:

Leucocitos	
Neutrófilos	
Hemoglobina	
Hematocrito	
plaquetas	
Creatinina	
Urea	
Na+/K+	
Bilirrubina	
GOT/GPT	
D- dímeros	n/a
I Quick	n/a

-Se extrae muestra para centro de investigación: si / no

Obs: se extraerá la primera muestra dentro de los 7 días previos al inicio de QT y la segunda muestra 21 días después del tercer ciclo de quimioterapia.

Referencia Nro: ( de la muestra)

### Datos de toxicidad según clasificación de la OMS

Toxicidad	Grado	Fecha de inicio de síntomas post QT	Persiste en la visita actual si/ no
Leucopenia			
Fiebre Neutropénica			
Anemia			
Trombopenia			
Nauseas			
Vómitos			
Diarrea			
Mucositis			
R. alérgica			
Alopecia			
Rash			
Arritmia			
Fatiga			
Renal			
Neurológica			
Cutánea			
Sangrado			
Trombosis			

Se aplica Quimioterapia: si / no

Precisa G- CSF:

Precisa otros tratamientos: (fecha de inicio y fin previstos)

Evaluación de respuesta (**tras el tercer ciclo**)

Estadio clínico T N M

Localización de las metástasis:

Lesiones diana

Localización	Tamaño en dimensiones	Método ( TAC, otro)	Fecha

Lesiones no diana

Localización	Presente si=1 no=2	Método	Fecha

Mejor respuesta obtenida:

RC	RP	EE	PR	NE	NR
----	----	----	----	----	----

ECG control: fecha e informe (pedirlo tras el tercer ciclo)

Fecha de próxima visita:

Valorado por:

**Anexo 3: ESTUDIO DE CELULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, CELULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, MICROPARTICULAS CIRCULANTES Y MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR NO MICROCITICO**

**Recogida de Datos: visitas de seguimiento**

SERIE	
Fecha	
Apellidos y Nombre	
NHC	

Enfermedad actual:

Tratamiento actual:

**Exploración física:**

TA      FC      Tº              PS

Exploración Normal	Exploración anormal ( describir)

Datos de laboratorio:

Leucocitos	
Neutrófilos	
Hemoglobina	
Hematocrito	
plaquetas	
Creatinina	
Urea	
Na+/ K+	
Bilirrubina	
GOT/GPT	
D- dímeros	n/a
I Quick	n/a

Datos de toxicidad según clasificación de la OMS

Toxicidad	Grado
Leucopenia	
Fiebre Neutropénica	
Anemia	
Trombopenia	
Nauseas	
Vómitos	
Diarrea	
Mucositis	
R. alérgica	
Alopecia	
Rash	
Arritmia	
Fatiga	
Renal	
Neurológica	
Cutánea	
Sangrado	
Trombosis	

Valoración:

Vivo sin enfermedad	Vivo con enfermedad	Muerto sin enfermedad	Muerto con enfermedad	Pérdida de seguimiento
---------------------	---------------------	-----------------------	-----------------------	------------------------

Progresión: si no

Fecha	
Tipo Local/ a distancia/ ambas	

Localización	
Tratamiento de segunda línea	

Fallecimiento:

Fecha y motivo:

Fecha de próxima visita

Valorado por:

Anexo 4: **ESTUDIO DE CELULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, CELULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, MICROPARTICULAS CIRCULANTES Y MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR NO MICROCITICO**

Hoja de fin de tratamiento.

Fecha

Motivo: Señale con una X

Tratamiento completado	
Progresión	
Toxicidad	
Fallecimiento	
Pérdida de seguimiento	
Decisión del paciente/ investigador	
Otra causa	

Progresión.

Localización y fecha:

Fallecimiento.

Causa y fecha:

Mejor respuesta obtenida y fecha:

RC	RP	EE	PR	NE	NR
----	----	----	----	----	----

Valorado por:

**ANEXO 5. HOJA INFORMATIVA AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

ESTUDIO DE CELULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, CELULAS ENDOTELIALES PROGENITORAS CIRCULANTES, MICROPARTICULAS CIRCULANTES Y MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR NO MICROCITICO

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Tania Fleitas Kanonnikoff

**Correo electrónico:** [tfleitas@hotmail.com](mailto:tfleitas@hotmail.com)

EQUIPO INVESTIGADOR:

Gaspar Reynés Muntaner, José Gomez Codina, María Martín Ureste, Miquel Pastor Borgoñón, Tania Fleitas Kanonnikoff y Joaquín Montalar Salcedo **del Servicio de Oncología Médica**

Vicenta Martínez Sales, Virtudes Vila y Edelmiro Réganon, **Centro de Investigación**

CENTRO:

**Hospital Universitario La Fe, Valencia**

VERSIÓN Y FECHA:

Versión 1, de fecha 8 de mayo de 2008

## **I. INTRODUCCIÓN**

Nos dirigimos a Ud. para informarle sobre un estudio de investigación, aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario La Fe, en el que se le invita a participar.

Nuestra intención es que Ud. reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar, si quiere o no participar en este estudio.

Para ello, le ruego lea esta hoja informativa con atención, pudiendo consultar con las personas que considere oportuno, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

## **II. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

**Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria, y que puede decidir no participar, o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni produzca perjuicio alguno en su tratamiento.**

## **III. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO**

El cáncer de pulmón representa un importante problema de salud pública. En España, la incidencia anual es de unos 18500 casos. En los últimos años ha despertado

un creciente interés el papel que juega en el crecimiento tumoral la formación de nuevos vasos sanguíneos por el tumor.

**El objetivo de este estudio es comprobar si una serie de proteínas y de células presentes en la sangre, pueden tener valor pronóstico y si sus niveles tras la administración de quimioterapia se asocian con la respuesta tumoral y la aparición de trombosis en pacientes con cáncer de pulmón .**

Se prevén incluir 150 pacientes y la duración del estudio será de 3 años.

#### **IV. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.**

Usted recibirá en cualquier caso el tratamiento adecuado para su enfermedad. Además si entra en este estudio se conocerán mejor algunos aspectos relacionados con su enfermedad y contribuirá a esclarecer aspectos mal conocidos de esta enfermedad que podrán ser útiles en el futuro.

Este estudio se realizará a partir de las muestras de sangre que habitualmente se le extraerán para controlar el tratamiento. Por lo tanto no requiere ninguna extracción de sangre adicional.

No se prevén riesgo o inconvenientes para usted.

#### **V. CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS**

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual se deberá dirigir al responsable del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo el responsable del estudio y sus colaboradores podrán relacionar dichos datos con Ud. y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna sin su consentimiento.

El acceso a su información personal quedará restringido al responsable del estudio y sus colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país.

Bajo ningún concepto y en ningún momento las muestras serán motivo de lucro directo, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

ESTUDIO DE CELULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, CELULAS ENDOTELIALES PROGENITORAS CIRCULANTES, MICROPARTICULAS CIRCULANTES Y MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR NO MICROCITICO

Yo,.....,

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

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

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha: .....

Firma del participante: .....

Revocación del consentimiento arriba señalado

Firma del participante: .....

Fecha.....

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA REPRESENTANTE LEGAL:**

ESTUDIO DE CELULAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, CELULAS ENDOTELIALES PROGENITORAS CIRCULANTES, MICROPARTICULAS CIRCULANTES Y MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR NO MICROCITICO

Yo,....., en calidad de (relación con el participante).....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con (nombre del investigador):.....

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

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

En mi presencia se ha dado a (nombre del participante)..... toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que.....(nombre del participante) participe en el estudio.

Fecha: .....

Firma del representante legal.....

Revocación del consentimiento arriba señalado

Firma del representante: .....

Fecha.....

**Anexo 6:** Relación de artículos publicados y presentaciones en congresos de los resultados preliminares del proyecto.

- Fleitas T, Martínez-Sales V, Gómez-Codina J, Martín M, Reynés G. [Circulating endothelial and endothelial progenitor cells in non-small-cell lung cancer](#). Clin Transl Oncol. 2010 Aug; 12(8):521-5. Revisión.

- Fleitas T, Reynés G, Martínez-Sales V, Vila V, Gomez-Codina J, Montalar J. Células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales, micropartículas circulantes y marcadores de angiogénesis en un paciente con CPCNP avanzado. Cancer de pulmón. Actualidad. Nº18. 2010 Dec .ISSN 1887-1844.

- Fleitas T, Martínez–Sales V, Vila V, Reynés G, Gómez-Codina J, Martín M, Montalar, Pastor M, Reganon E. Células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales circulantes, micropartículas y marcadores de angiogénesis e inflamación en pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico avanzado. I Simposio Nacional SEOM. Madrid. 2010. Oct. Comunicación oral.

- Vila V, Martínez-Sales V, Tania Fleitas, Régonon E. Research Center, Hospital La Fe. Valencia. THROMBIN GENERATION ASSOCIATED WITH MICROPARTICLES: REGULATION BY PHOSPHATIDYL SERINE AND TISSUE FACTOR PATHWAY. 21st International Congress on Thrombosis. Milán, 2010. Jul. Póster

- Fleitas T, Martínez–Sales V, Vila V, Reynés G, Gómez-Codina J, Martín M, Reganon E. Circulating endothelial cells, microparticles and markers of angiogenesis and inflammation in patients with advanced non-small cell lung cancer. 21st International Congress on Thrombosis. Milán, 2010. Jul. Póster

- Fleitas T, Reynes G, Martinez-Sales V,Vila V, Reganon E; Mesado D, Martín M, Gomez-Codina J, Montalar J. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells,microparticles and markers of inflammation and coagulation in advanced non small cell lung cancer. Abstract nro 7583. ASCO Annual Meeting (June 3-7, 2011)