



Universidad de Granada



**VALOR PRONÓSTICO DE LA
DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES
EN PACIENTES CON CÁNCER DE
PULMÓN NO MICROCÍTICO SOMETIDOS
A TRATAMIENTO QUIRÚRGICO RADICAL**

Clara Isabel Bayarri Lara

Granada, 2015

Tesis Doctoral

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Clara Isabel Bayarri Lara
ISBN: 978-84-9125-839-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43579>

Dña. María José Serrano Fernández, Investigadora principal del grupo de “Biodinámica de Células Tumorales Circulantes, Microambiente Tumoral y metástasis” en el Centro Pfizer-UGR-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENyO), Granada.

D. José Luis García Puche. Doctor en Medicina y Director de la Unidad de Oncología Médica del Hospital Universitario San Cecilio de Granada

D. Antonio Cueto Ladrón de Guevara. Doctor en Medicina y Cirugía y actual Director de la Unidad de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada

Certifican que:

CLARA ISABEL BAYARRI LARA, Licenciada en Medicina ha realizado la Tesis Doctoral ***“Detección y Caracterización de Células Tumorales Circulantes en pacientes con Cáncer de Pulmón No Microcítico sometidos a tratamiento quirúrgico radical”***, en el centro GENyO, y en la UGC de Cirugía Torácica del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, para aspirar al grado de Doctor en Medicina. Este trabajo de investigación reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado.

En Granada, a 09 de Noviembre de 2015

Dra. Maria José Serrano Fernandez

Dr Antonio Cueto Ladrón de Guevara

Dr Jose Luis García Puche

Doctorando: Clara Isabel Bayarri Lara

El doctorando **Clara Isabel Bayarri Lara** y los directores de la tesis **Dña Maria José Serrano Fernández, D. Jose Luis García Puche y D. Antonio Cueto Ladrón de Guevara**

.Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que:

El trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 12 de Noviembre de 2015

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Dña Maria José Serrano Fernández

D. Jose Luis García Puche

D. Antonio Cueto Ladrón de Guevara

Fdo.:

Clara Isabel Bayarri Lara

A mis padres

A mi hermana

A Nacho

Agradecimientos

A los Directores de esta Tesis, la Dra. Maria José Serrano, el Dr. José Luis García Puche y el Dr. Antonio Cueto sin cuya ayuda, confianza y dedicación este trabajo habría sido imposible.

A mis compañeros, Abel Sánchez Palencia, Javier Ruiz Zafra y Florencio Quero por su ayuda y apoyo durante todo este tiempo.

A los residentes de nuestro Servicio, tanto los actuales, Maria Jose Moyano y Julio Ricardo Torres Bermudez, como los que hemos tenido la suerte de tener con nosotros durante su formación, en especial el Dr. Carlos Giraldo Ospina que han sido una parte fundamental en el proyecto.

A todo el personal de la planta de Cirugía Torácica, en especial al supervisor Juan Antonio Navajas, gracias por su disponibilidad y dedicación.

A todos los integrantes de GENyO por su trabajo y por haberme permitido integrarme en un proyecto tan apasionante como es la Investigación

A Ignacio Mancera sin cuyo apoyo metodológico y de toda índole este trabajo no habría podido ser realizado

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUCCIÓN | 11 |
| 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN | 12 |
| 1.2 ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PULMÓN | 13 |
| 1.3 HISTOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN | 17 |
| 1.4 CLÍNICA | 20 |
| 1.5 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN | 21 |
| 1.6 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN EN ESTADIOS PRECOCES | 26 |
| 1.6.1 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO | 27 |
| 1.6.2 TRATAMIENTO ADYUVANTE | 28 |
| 1.7 RESULTADOS TRAS TRATAMIENTO QUIRÚRGICO. SUPERVIVENCIA GLOBAL, SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD Y RECURRENCIA. | 32 |
| 1.8 FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES | 35 |
| 1.8.1 FACTORES CLÍNICOS | 35 |
| 1.8.2 BIOMARCADORES | 36 |
| 1.9 DISEMINACIÓN TUMORAL | 40 |
| 1.10 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES | 43 |
| 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO. | 48 |
| 3. OBJETIVOS. | 51 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 53 |
| 4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO. | 54 |
| 4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO | 54 |
| 4.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN. | 54 |
| 4.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN. | 55 |
| 4.3. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES. | 56 |
| 4.4. PROTOCOLO DEL ESTUDIO | 57 |
| 4.5 DETERMINACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES | 59 |
| 4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 63 |
| 4.7 LIMITACIONES DEL ESTUDIO | 63 |
| 5. RESULTADOS | 65 |
| 5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO | 66 |
| 5.2 DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES | 67 |
| 5.3 ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CTCs Y VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CTCs | 69 |
| 5.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CTCsEGFR+ Y VARIABLES CLÍNICOPATOLÓGICAS | 70 |
| 5.6 RESULTADOS DE DEL SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES | 71 |
| 5.7 IMPACTO PRONÓSTICO DE LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CTCs | 73 |
| 6. DISCUSIÓN | 83 |
| 7. CONCLUSIONES | 90 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón (CP) o carcinoma broncogénico se define como una neoplasia maligna que se origina en la vía aérea o parénquima pulmonar y es considerada una de las neoplasias más frecuentes y que ocasiona una mayor mortalidad.

Las variables histológicas no microcíticas (CPNM) constituyen el 80% de todos los tumores primarios de pulmón.

A nivel mundial en el año 2014 el cáncer de pulmón afectó a 1.8 millones de pacientes y fue la causa de muerte en 1.6 millones, representando la segunda neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada en los EEUU en hombres y mujeres, tras cáncer de próstata y cáncer de mama respectivamente¹ Así mismo fue la principal causa de muerte atribuida a cáncer en ambos sexos con más de 25% de las muertes estimadas debidas a cáncer en dicho año¹ (Figura 1). Desde los años 50 el cáncer de pulmón se ha convertido en la principal causa de muerte atribuida a cáncer en hombres y en 1985 alcanzó a ser de igual forma en mujeres, causando aproximadamente el doble de muertes que el cáncer de mama. La mortalidad del cáncer de pulmón ha comenzado a descender en hombres y se ha empezado a estabilizar en mujeres en probable relación al descenso del hábito tabáquico².

En España en el año 2012 se diagnosticaron 26715 nuevos casos, siendo el segundo cáncer más frecuente en hombres y el cuarto en mujeres. Para ambos sexos el cáncer de pulmón fue el que supuso una mayor mortalidad (20,6%)³.

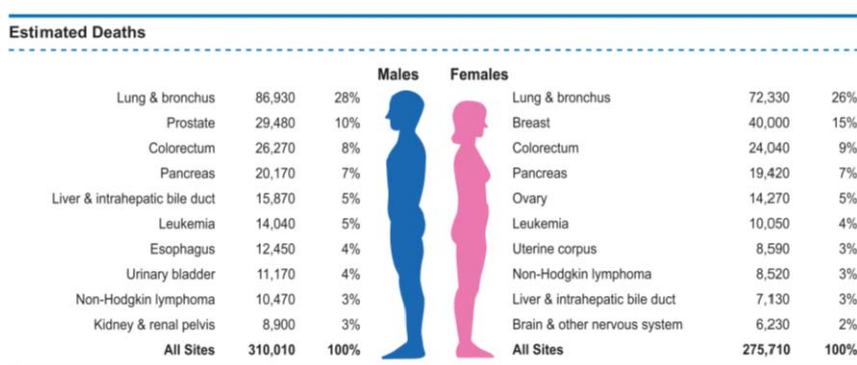


Figura 1. Causa de muerte por cáncer en Estados Unidos. Estimación en 2014. (Tomado de Siegel et al. Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin. 2014;64(1):9-29)

1.2 ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO

La exposición a determinados agentes tanto ambientales como ocupacionales así como la susceptibilidad individual a los mismos determinan el riesgo individual al desarrollo de cáncer de pulmón.

1.2.1 TABAQUISMO

El tabaquismo activo constituye la principal causa de cáncer de pulmón considerándose actualmente responsable, en los países desarrollados, de aproximadamente un 90% de estos tumores en la población masculina y entre 60-80% de los diagnosticados en mujeres.⁴ El riesgo es directamente proporcional a la duración del hábito y la intensidad del consumo.

Una de las primeras descripciones del cáncer de pulmón fue realizada por Adler en 1912, en la que ya sugiere la posibilidad de que la inhalación del humo del tabaco pueda relacionarse con su aparición⁵. El primer estudio científico que mostró una asociación entre tabaco y mayor riesgo de muerte prematura fue publicado en 1938⁶. No sería hasta 1950 cuando Doll y Hill demostraron mediante un estudio de casos y controles la asociación epidemiológica entre el cáncer de pulmón y el humo de tabaco así como la influencia de la cantidad de tabaco consumido y el desarrollo de este tumor⁷.

En el humo del tabaco se han identificado más de 5000 compuestos de los cuales 73 han sido considerados carcinógenos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer. Entre ellos se incluyen los hidrocarburos aromáticos (HPAs), las N-nitrosaminas, las aminas aromáticas y otros componentes orgánicos e inorgánicos como el benceno, arsénico y cromo. En relación con el cáncer de pulmón los carcinógenos sobre los que hay una mayor evidencia son los HPA como el benzo(a)pireno y la nitrosamina específica del tabaco 4'-(nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, que también es conocida como nitrosamina derivada del tabaco (NNK)⁸. Muchos son el sustrato de enzimas catabolizadoras de drogas como el citocromo P450 que actúa ante ellos de forma similar a la exposición a otra sustancia extraña, mediante reacciones de detoxificación añadiendo átomos de oxígeno para aumentar su solubilidad en agua y facilitar su excreción. Estas reacciones dan lugar a productos intermedios que reaccionan con el DNA dando lugar a aductos de DNA. Es conocida la relevancia de la formación de estos aductos en proceso de carcinogénesis.

Las células disponen de mecanismos de reparación del DNA para eliminarlos pero algunos escapan a la misma ocasionando alteraciones durante la replicación del DNA, como puede ser la inserción de una base equivocada opuesta al adusto. El resultado será una mutación permanente, que de ocurrir en una región crítica de un oncogén como KRAS o de un gen supresor como TP53, dará lugar a la pérdida de los mecanismos de control de crecimiento celular y al desarrollo del cáncer⁸⁻¹⁰. Los principales mecanismos

implicados en la carcinogénesis en relación al tabaco se encuentran los resume Hecht en el siguiente esquema⁸ (Figura 2).

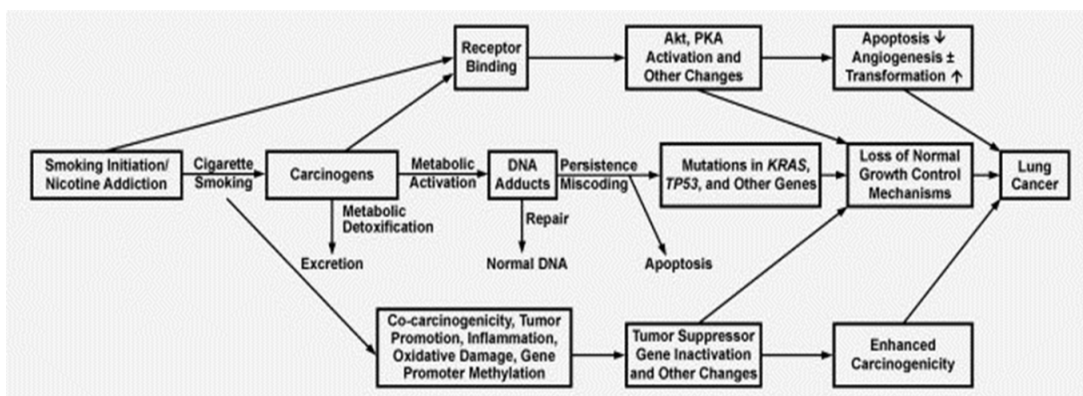


Figura 2. Carcinogénesis pulmonar producida por el Tabaco. Tomado de Hecht et al. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. Int J Cancer. 2012;131(12):2724-2732.

1.2.2 TABAQUISMO PASIVO

El tabaquismo pasivo, o exposición a humo ambiental del tabaco también puede contribuir a un incremento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón con una relación dosis dependiente entre el grado de exposición y el riesgo relativo. En metaanálisis realizados para analizar el riesgo asociado al tabaquismo pasivo encuentran un riesgo incrementado de un 24% en no fumadores que viven con fumadores¹¹. Otro estudio realizado en mujeres no fumadoras encontró que aquellas que eran esposas de fumadores activos tenían un 30% de incremento del riesgo de cáncer de pulmón¹². Revisando la evidencia disponible se calcula una OR de 1.34 de riesgo asociado a exposición ambiental de tabaco, con un incremento del riesgo en no fumadores de un 30% para todos los tipos de cáncer¹⁰.

1.2.3 CARCINÓGENOS OCUPACIONALES

Diversas sustancias relacionadas con el ámbito laboral se han propuesto como posibles carcinógenos. La Agencia Internacional para Estudio del Cáncer (IARC) ha identificado como posibles carcinógenos ambientales entre otros al asbesto, arsénico, berilio, cadmio, cromo, níquel sílice y cloruro de vinilo.

En el año 2000 se estimó que el 10% del cáncer de pulmón en hombres y el 5% en mujeres a nivel mundial podría atribuirse a la exposición de 8 carcinógenos ocupacionales como asbesto, arsénico, berilio, cadmio, cromo, níquel, sílice y gases de diesel¹³.

1.2.4 ASBESTO

De entre un gran número de sustancias, el asbesto es considerado como el carcinógeno ocupacional y ambiental más importante. Con el término asbesto ("inagotable", "indestructible") se denomina a un grupo de minerales fibrosos con distinta composición química y configuración. Aunque su utilización data de antiguo, fue a partir del siglo XIX cuando comenzó a utilizarse en la industria, y se empleó de forma creciente hasta estas últimas décadas, cuando, tras determinarse su gran poder patogénico, ha decrecido su uso. Se clasifican atendiendo a su configuración en: grupo serpentinas (fibras curvadas), de los que el principal es el crisotilo o amianto blanco, y grupo anfíboles (fibras rectas), donde figuran la amosita o asbesto marrón, la crocidolita o asbesto azul, la antofilita o asbesto amarillo, la tremolita y la actinolita¹⁴. Existen 3 fuentes de exposición: ocupacional, doméstica y ambiental.

En cuanto a la exposición ocupacional los trabajadores de la construcción son los que probablemente estarán más expuestos en los próximos años, puesto que durante décadas el amianto tuvo múltiples usos y aplicaciones en el sector de la construcción de edificios.

La exposición doméstica es la que tienen los familiares de los trabajadores del asbesto al quedar fibras en la ropa de trabajo. También es debida a exposiciones contaminantes dentro del hogar. Por su parte la exposición ambiental se da sobre todo en los países donde se explota el mineral de asbesto, como Sudáfrica, Australia, Canadá, etc., donde se ha detectado en varios kilómetros alrededor de las minas empolvamiento con fibras de asbesto y en los que los casos de cáncer de pulmón y mesotelioma son muy superiores a lo esperado.

La exposición a asbesto se relaciona con diferentes patologías pleurales y pulmonares. La asbestosis es una forma difusa de fibrosis intersticial pulmonar producida por la inhalación de fibras de amianto, que afecta a ambos pulmones y que se puede detectar en los estudios radiológicos del tórax. Hay una clara relación dosis-respuesta entre la exposición al amianto y el riesgo de desarrollar asbestosis, de tal modo que los más expuestos tienen más riesgo de presentar la enfermedad. Entre los trabajadores expuestos a asbesto, los que presentan asbestosis tienen una mayor incidencia de cáncer, incremento que puede ser hasta 6 veces mayor. En otras enfermedades intersticiales pulmonares también se ha publicado una mayor incidencia de cáncer de pulmón, por lo que los factores responsables de la asociación encontrada no están bien identificados. El grado de fibrosis, el tipo de fibra y el tabaquismo parecen ser factores relacionados^{14,15}.

1.2.5 RADÓN

Se trata de un gas inerte que es producto de la degradación del radio que se encuentra en la mayoría de los suelos; siendo los trabajadores de minas

subterráneas, bodegas, cuevas, túneles, etc., los que tienen un mayor riesgo. Estudios realizados en mineros no fumadores constataron un incremento del riesgo de cáncer de pulmón entre el 1,9% y 29,2% en relación directa con la intensidad de la exposición y un descenso del mismo cuando se abandona el trabajo¹⁶. Al igual que con el asbesto, existe un efecto sinérgico con el consumo de tabaco.

Además, este gas puede acumularse en los edificios. En un metaanálisis publicado en 2005 incluyendo 13 estudios de casos-control europeos, y se informó de una relación lineal entre el acúmulo de radón detectado en los hogares y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. El incremento del riesgo era pequeño pero estadísticamente significativo y los autores estimaron que la exposición al radón puede ser responsable de más de un 2% de las muertes por cáncer de pulmón en Europa¹⁷. En estudio de casos y controles realizado en Galicia, se encontró que concentraciones incluso inferiores a las recomendadas el radón podía asociarse a 2.5 mayor riesgo de cáncer de pulmón^{16,18}

1.2.6 ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Ciertas enfermedades respiratorias no malignas se han asociado con un mayor riesgo de cáncer de pulmón, la más importante la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), junto a otras enfermedades pulmonares que determinan el desarrollo de una fibrosis pulmonar como la fibrosis pulmonar idiopática, la asbestosis o la silicosis¹⁹. La prevalencia de cáncer de pulmón en EPOC es 6 veces mayor que en fumadores sin ese diagnóstico, sugiriendo que el EPOC por sí mismo es un factor de riesgo independiente¹⁰.

Algunos estudios estiman la prevalencia de EPOC en pacientes con cáncer de pulmón es un 50-65% superior al resto de pacientes²⁰, así mismo un estudio de cohortes publicado en el año 2000 concluye que los individuos con fibrosis pulmonar difusa tienen entre 8 y 14 veces incrementado el riesgo de cáncer de pulmón²¹.

1.2.7 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA

La posibilidad de padecer un CP, ha sido definida como la interrelación entre la exposición a carcinógenos ambientales y la susceptibilidad individual determinada genéticamente. Sería esta susceptibilidad la que explicaría por qué siendo el tabaco responsable de más del 90% de los CP en el hombre y del 80% en la mujer, sólo un 11-12% de los fumadores desarrollan un cáncer de pulmón²². Se ha comprobado también que los familiares directos de los enfermos diagnosticados de CP tienen un riesgo de presentar la enfermedad entre 2 y 6 veces mayor que quienes carecen del parentesco²³.

Esta susceptibilidad vendría determinada por alteraciones congénitas en los genes que codifican proteínas esenciales en el metabolismo de los

carcinógenos, sobre todo del humo del tabaco. Dichos genes que modulan la respuesta del organismo frente a las sustancias cancerígenas con la reparación de ADN, activación o inactivación de carcinógenos, fundamentalmente pueden presentar polimorfismos que dan lugar a alteraciones en la estructura, la función o las concentraciones de las diferentes enzimas que codifican.

Así, ciertas variantes de las enzimas activadoras de carcinógenos (enzimas de fase I), la ausencia de algunas enzimas detoxificantes de carcinógenos (enzimas de fase II) y otros polimorfismos en genes reparadores de ADN se asociarían a un riesgo superior de presentar CP en las personas portadoras.

Entre las enzimas de fase I, las más significativas son las derivadas de polimorfismos de los genes CYP (citocromo P450) relacionados con la activación de importantes procarcinógenos del humo del tabaco (aminas aromáticas, hidrocarburos, etc.). Entre ellos destaca el CYP1B1, con un reciente metaanálisis que concluye que el polimorfismo en el citocromo P450 1B1Leu432Val está asociado con un incremento en el riesgo de cáncer de pulmón en caucásicos y fumadores²⁴.

La glutatión S-transferasa (GST) es la más representativa de las enzimas detoxificantes de cancerígenos (enzimas de fase II) y tiene más de 20 isoenzimas (GSTM1, GSTT1, GSTP1, etc.). Igualmente algunos metaanálisis determinan que la carencia de GSTM1²⁵ podría ser un potencial biomarcador de mayor riesgo de cáncer de pulmón en la población china, aunque advierten que son necesarios posteriores estudios al respecto para extraer conclusiones definitivas.

Otros estudios han mostrado igualmente que los polimorfismos en CYP1A1 MspI y GSTM1 se relacionan con un incremento en el riesgo de cáncer de forma independiente a otros factores y que ambos se relacionan entre sí. Sin embargo estos hallazgos varían entre diferentes razas²⁶.

En definitiva, se ha visto como determinados polimorfismos genéticos podrían incrementar la posibilidad de experimentar CP.

1.3 HISTOLOGÍA

Como mencionamos con anterioridad, desde el punto de vista clínico la clasificación más relevante establece dos grandes grupos: El carcinoma microcítico o de células pequeñas (CPCP) y el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Este último es el más frecuente, representando el 80%¹⁰.

Entre ambos existen importantes diferencias en su forma de presentación, comportamiento biológico y manejo terapéutico.

Los avances descritos en biología molecular han dado una mayor importancia si cabe al diagnóstico histológico, que es ahora clave en las nuevas

estrategias de tratamiento individualizado²⁷. Durante años no existió un gran interés en la distinción entre los diferentes subtipos de CPNM dado que tampoco implicaba grandes diferencias en cuanto al tratamiento aplicado a cada uno de ellos. Sin embargo esto cambiaría de forma radical en 2004 con el descubrimiento de la importancia de las mutaciones del gen del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en los adenocarcinomas y su relación con una respuesta favorable a ciertos agentes quimioterápicos tales como los inhibidores de la tirosinkinasa (ITK)^{28,29}.

La clasificación histológica mundialmente aceptada es la publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2004³⁰:

1. LESIONES PREINVASIVAS

- Displasia escamosa/carcinoma in situ
- Hiperplasia adenomatosa atípica.
- Hiperplasia celular neuroendocrina difusa iopática

2. LESIONES INVASIVAS MALIGNAS

A. Carcinoma de células escamosas o epidermoide

- Papilar
- Células claras
- Células pequeñas
- Basaloide

B. Carcinoma de células pequeñas

- Combinación

C. Adenocarcinoma

- Acinar
- Papilar
- Bronquioloalveolar
- Micosecretor
- Adenocarcinoma de diferentes subtipos

D. Carcinoma de células grandes

- Carcinoma neuroendocrino de células grandes
- Carcinoma basaloide
- Carcinoma linfoepitelial-like
- Carcinoma de células claras
- Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide

E. Carcinoma adenoescamoso

F. Carcinomas con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos

G. Tumores carcinoides

- Carcinoide típico
- Carcinoide atípico

H. Carcinomas de tipo glándula salivar

I. No clasificables

En los últimos años se han propuesto importantes cambios en la clasificación de los adenocarcinomas. La heterogeneidad clínica, radiológica y molecular existente dentro de ese grupo llevó al desarrollo de una nueva clasificación de consenso por parte de un grupo de estudio multidisciplinar. En 2011 la IASLC (International Association for the Study of Lung) en colaboración con la ATS (American Thoracic Society) y la ERS (European Respiratory Society) propusieron una nueva clasificación que incorpora aspectos tanto histológicos como clínicos, moleculares, radiológicos y quirúrgicos³¹. De esta forma se constituyen grupos más homogéneos desde un punto de vista morfológico, clínico y biológico teniendo por tanto gran utilidad pronóstica y terapéutica^{28,31,32} (Tabla 1).

En la nueva clasificación el término de adenocarcinoma bronquioloalveolar deja de emplearse y se introducen dos nuevos tipos: el adenocarcinoma in situ (AIS) y el adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA). El AIS se describe como una lesión solitaria de pequeño tamaño (<3cm) con un 100% de crecimiento lepidico. El adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA) por su parte describe lesiones de menos de 3 cm, únicas, con crecimiento predominantemente lepidico y menos de 5 mm de invasión. En ambas entidades si se realiza una resección completa se alcanza una supervivencia libre de enfermedad cercana al 100%³³.

CLASIFICACIÓN DEL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

Lesiones preinvasivas

- Hiperplasia adenomatosa atípica
- Adenocarcinoma "in situ" (**<3cm, anteriormente bronquioloalveolar**)
 - No mucinoso
 - Mucinoso
 - Mixto mucinoso/ no mucinoso

Adenocarcinoma mínimamente invasivo (<3cm crecimiento predominantemente lepidico con menos de 5mm de invasión)

- No mucinoso
- Mucinoso
- Mixto mucinoso/no mucinoso

Adenocarcinoma invasivo

- Crecimiento predominantemente lepidico (anteriormente patrón bronquioloalveolar no mucinoso con >5mm de invasión)
- Predominio acinar
- Predominio papilar
- Predominio micropapilar
- Predominantemente sólido con producción de mucina

Variantes de adenocarcinoma invasivos

- Adenocarcinoma mucinoso invasivo (anteriormente bronquioloalveolar invasivo)
- Coloide
- Fetal (bajo o alto grado)
- Entéricos

Tabla 1. Clasificación de los adenocarcinoma para especímenes estudiados en piezas quirúrgicas resecaadas, conforme a la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC)

1.4 CLÍNICA

Desde el punto de vista clínico el cáncer de pulmón se caracteriza por una presentación clínica tardía. Esto es en gran parte reflejo de las peculiaridades anatómicas del pulmón, de tal forma que un nódulo pulmonar puede crecer durante un considerable periodo de tiempo, e incluso diseminarse fuera del pulmón produciendo metástasis a distancia antes de producir síntomas³⁴.

Debido a esto a su presentación inicial, la mayoría de pacientes con cáncer de pulmón se encuentran en un estadio avanzado. Se calcula que en el momento del diagnóstico el 80% de los pacientes son inoperables y solo aproximadamente un 20% serán candidatos a tratamiento quirúrgico³⁵.

Los signos y síntomas dependen de la localización del tumor, la diseminación locorregional y la diseminación a distancia. Así mismo el cáncer de pulmón puede asociarse a diferentes síndromes paraneoplásicos³⁵. Un porcentaje de pacientes cada vez mayor de casos se diagnostican de forma casual por un hallazgo radiológico, en el contexto de una infección respiratoria, un estudio preoperatorio o una radiografía de tórax solicitada por otros motivos, este porcentaje oscila entre el 2-15% en distintos estudios y en función del área geográfica³⁶.

Los tumores que aparecen en la vía aérea producen síntomas relacionados con el crecimiento del tumor. Entre los más frecuentes se encuentra la disnea, tos persistente, sibilancias y estridor; si el tumor obstruye el bronquio puede aparecer una zona atelectásica con sobreinfección distal en forma de neumonía o absceso. En ocasiones, si el tumor sangra es frecuente la aparición de esputos hemoptoicos o, incluso, hemoptisis franca.

La hemoptisis se considera el síntoma predictor más significativo asociado a cáncer de pulmón, aunque solo aparece en una quinta parte de estos pacientes. Los programas destinados al diagnóstico precoz deben por tanto considerar diversos síntomas, y además de su presencia la evolución de los mismos³⁷.

Otros síntomas reflejan la invasión de espacios o estructuras adyacentes al pulmón, como el mediastino (disfonía, síndrome de vena cava), diafragma, pleura o pared costal (dolor torácico, síndrome de Horner).

Con menos frecuencia el tumor comienza a manifestarse con síntomas o signos de metástasis a distancia (pleura, hígado, hueso, cerebro, suprarrenales). Si bien en el momento del diagnóstico el 80% de los pacientes tienen fatiga y disminución de su actividad normal y la mayoría de ellos presentan astenia, disminución del apetito y pérdida de peso, a lo que se denomina síndrome constitucional³⁵.

1.5 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN

A partir de una correcta anamnesis y exploración clínica y en base a los factores de riesgo y comorbilidad del paciente, puede establecerse un diagnóstico de sospecha. Una vez establecido un diagnóstico de sospecha la confirmación diagnóstica y estadificación se hará de acuerdo a protocolos estandarizados que incluyen pruebas de imagen y técnicas encaminadas a la obtención de muestras citológicas y preferiblemente histológicas que permitan llegar a un diagnóstico de certeza.

La tomografía axial computerizada (TC) se considera el método estándar para el diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón (Figura 3).

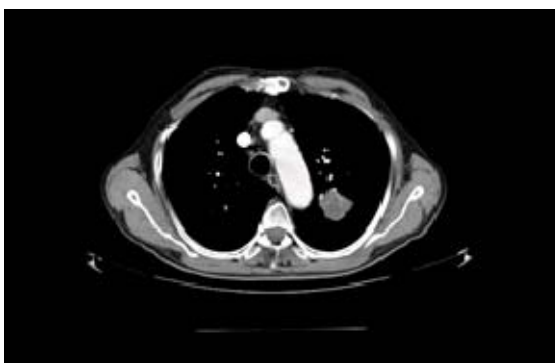


Figura 3 TC en paciente con carcinoma epidermoide en lóbulo pulmonar inferior izquierdo

Desde los años 90 la tomografía por emisión de positrones (PET) y más recientemente la combinación de ambas (PET-TC) se ha introducido en los algoritmos diagnósticos de los pacientes oncológicos, debido a la valiosa información funcional y anatómica que proporcionan (Figura 4). Además la PET presenta una elevada sensibilidad en la detección de metástasis ganglionares y a distancia, y ha sido incorporada a los protocolos de estadificación prequirúrgica del CPNM^{38,39}.

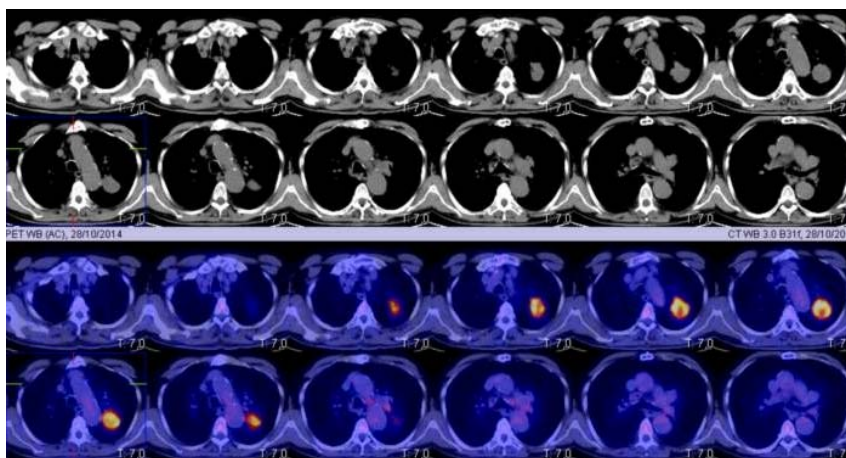


Figura 4. Imagen de PET-TC correspondiente al mismo paciente de la Fig 3 con un carcinoma epidermoide en lóbulo pulmonar inferior izquierdo

La confirmación diagnóstica se llevará a cabo mediante un estudio citológico, o siempre que sea factible histológico, obtenido mediante diferentes técnicas más o menos invasivas. Las reconocidas por el American College of Chest Physicians (ACCP) incluyen: citología de esputo, fibrobroncoscopia, biopsia transbronquial, biopsia transparietal percutánea y cada vez con mayor relevancia las técnicas endoscópicas guiadas por ultrasonidos (EBUS, EUS)⁴⁰.

1.5.2 ESTADIFICACIÓN

En cualquier enfermedad neoplásica es de vital importancia contar con un sistema de estadificación seguro y fácilmente reproducible, que emplee una nomenclatura estandarizada y que agrupe a los pacientes de acuerdo al comportamiento biológico del tumor, y que por tanto tendrán un pronóstico similar y tratamientos similares⁴¹

La estadificación pretende por tanto describir y clasificar los tumores de acuerdo a su extensión de una forma estandarizada que permita: 1 Ayudar al clínico a establecer un plan terapéutico. 2 Dar información sobre el pronóstico de la enfermedad. 3 Ayudar a la evaluación de los resultados tras el tratamiento. 4 Facilitar el intercambio de información y comparación de resultados. 5 Contribuir a la investigación contra el cáncer permitiendo una descripción estandarizada de los tumores pulmonares, la comparación de resultados entre distintos estudios clínicos y encuadrar a los pacientes en estadios dentro de los cuales el pronóstico y la estrategia terapéutica sean similares.

La *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) y el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) son las principales organizaciones internacionales responsables de la generación de las normas y escalas de estadificación de los tumores malignos.

LA UICC acuerda en 1953 adoptar como método de clasificación para los tumores malignos el sistema TNM que Pierre Denoiz había desarrollado entre 1943 y 1952⁴².

En 1966 la UICC recomendó el sistema TNM para la estadificación del cáncer de pulmón y dos años más tarde, lo publicó en su primera edición de la clasificación TNM de los tumores malignos. En 1973 la AJCC propone un sistema de estadificación clínica utilizando el sistema TNM, basado en un estudio realizado por el Dr Mountain con 2155 pacientes. Esta propuesta fue adoptada por la UICC en su segunda clasificación TNM⁴³⁻⁴⁵.

Desde entonces se han publicado por parte de dichas sociedades sucesivas ediciones, incorporando modificaciones en un intento por conseguir grupos cada vez más homogéneos. La vigente clasificación es la séptima edición aprobada en 2009.⁴⁶

Para actualizar y mejorar la 6ª edición, la IASLC, de acuerdo con la International Union Against Cancer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC) creó un Comité Internacional de Estadificación que recogió retrospectivamente los datos de 100.869 pacientes. Fueron diagnosticados entre 1990 y 2000, seguidos clínicamente al menos durante 5 años y procedían de 45 fuentes distintas (registros, ensayos clínicos, series quirúrgicas y hospitalarias) de 20 países.

La 7ª edición del Manual de Estadificación TNM publicada a fines de 2009 y vigente desde el 1° de enero de 2010, ha incorporado en la estadificación del carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) cambios sustanciales, especialmente referidos al tamaño tumoral y mapeo ganglionar-, proponiendo además una nueva agrupación en estadios⁴⁷ (Tabla 2)

Para cada uno de los estadios se obtuvieron las diferentes curvas de supervivencia, que, sin solaparse entre ellas, presentaban peores cifras a medida que aumentaba la extensión tumoral. Se confirma así la nueva agrupación de estadios (Tabla 1), cuyas supervivencias a los 5 años, para cada estadio, fueron, según la estadificación clínica y la patológica, respectivamente, las siguientes: IA, 50 y 73%; IB, 43 y 58%; IIA, 36 y 46%; IIB, 25 y 36%; IIIA, 19 y 24%; IIIB, 7 y 9%, y IV, 2 y 13%.⁴⁸

El sistema TNM se basa en tres descriptores:

- Descriptor T: extensión del tumor primario
- Descriptor N: La ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos locales y regionales
- Descriptor M: La ausencia o presencia de metástasis a distancia

7ª EDICIÓN CLASIFICACIÓN TNM

Tumor primario - T

- **TX:** Tumor primario que no puede ser evaluado, o tumor probado por la existencia de células tumorales malignas en esputo o lavados bronquiales pero no visualizado por métodos de imagen o broncoscopia.
- **T0:** Sin evidencia de tumor primario.
- **Tis:** Carcinoma in situ.
- **T1:** Tumor ≤ 3 cm en su mayor diámetro, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal del bronquio lobar (es decir: no hay invasión en el bronquio principal).
- **T1a:** Tumor ≤ 2 cm en su mayor diámetro.
- **T1b:** Tumor > 2 cm pero ≤ 3 cm en su mayor diámetro.
- **T2:** Tumor > 3 cm pero ≤ 7 cm en su mayor diámetro o tumor con cualquiera de las siguientes características:
 - T2a si su diámetro es ≤ 5 cm: afecta al bronquio principal, distante 2 cm o más de la carina principal; invade la pleura visceral; asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hiliar pero no afecta al pulmón entero.
 - T2a: Tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm en su mayor diámetro.
 - T2b: Tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm en su mayor diámetro.
- **T3:** Tumor > 7 cm o de cualquier tamaño que invada directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo los tumores del sulcus superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o un tumor a menos de 2 cm de la carina principal pero sin invadirla; o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en su mismo lóbulo.
- **T4:** Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina; o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo diferente del pulmón homolateral.

N (ganglios linfáticos regionales)

- **NX:** Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
- **N0:** No existen metástasis ganglionares linfáticas regionales.
- **N1:** Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales e intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa.
- **N2:** Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos homolaterales y/o subcarinales.

- **N3:** Metástasis ganglionares linfáticas mediastínicas contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicas homolaterales o contralaterales, o supraclaviculares.

M (metástasis a distancia)

- **MX:** Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.
- **M0:** No existen metástasis a distancia.
- **M1:** Existen metástasis a distancia.
 - **M1a:** Existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo del pulmón contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) maligno
 - **M1b:** Existen metástasis a distancia.

| ESTADIOS TNM(7ª Edición) | |
|---------------------------------|--|
| Carcinoma oculto | TX N0 M0 |
| Estadio 0 | Tis N0 M0 |
| Estadio IA | T1a,b N0 M0 |
| Estadio IB | T2a N0 M0 |
| Estadio IIA | T2b N0 M0 T1a,b N1 M0 T2a N1 M0 |
| Estadio IIB | T2b N1 M0 T3 N0 M0 |
| Estadio IIIA | T1a,b, T2a,b N2 M0 T3 N1, N2 M0 T4 N0, N1 M0 |
| Estadio IIIB | T4 N2 M0 Cualquier T N3 M0 |
| Estadio IV | Cualquier T N M1 |

Tabla 2. Estadios TNM de acuerdo a la 7ª edición

1.6 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO EN ESTADIOS PRECOCES

En los últimos años como hemos visto, se han introducido importantes avances en diferentes áreas relacionadas con el diagnóstico y estadificación del CPNM, tales como la nueva clasificación patológica de los adenocarcinomas o la última edición de la estadificación TNM. Todo ello ha contribuido a una mejor planificación y elección de las distintas estrategias terapéuticas, incluyendo una mejor selección de pacientes candidatos a tratamiento quirúrgico.

Así mismo hemos asistido a importantes avances en las técnicas quirúrgicas y a un desarrollo sin precedentes de la cirugía mínimamente invasiva en el cáncer de pulmón. Todo ellos con la finalidad de mejorar los resultados, disminuyendo la morbimortalidad postoperatoria y el pronóstico a largo plazo de estos pacientes.

Del mismo modo se ha profundizado en el papel del tratamiento multimodal en estadios iniciales, con la investigación de diferentes esquemas de tratamiento adyuvantes a la cirugía, en un intento de mejorar la supervivencia y los resultados en estos pacientes^{49,50}.

1.6.1 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

La resección quirúrgica constituye el tratamiento de elección y se considera el método más eficaz para modificar la historia natural del cáncer de pulmón, consiguiendo un mejor control del tumor primario y mejores tasas de supervivencia, que se sitúan en torno 60% a los 5 años tras resección completa. Está indicada como tratamiento único o en combinación con otras modalidades de tratamiento en estadios iniciales y localmente avanzados, consiguiendo una supervivencia que oscila entre el 60-80% para el estadio I y entre el 30-50% para el estadio II^{48,51,52}. En comparación con estos resultados la historia natural del CPNM en estadios I y II no tratados se asocia a una supervivencia global de entorno al 15% a los 5 años⁵³.

La indicación de tratamiento quirúrgico se establece en base al tipo histológico y el estadio, y teniendo en consideración factores referidos al pacientes como la edad, función respiratoria y comorbilidades. Con el término de operabilidad nos referimos al riesgo de mortalidad operatoria y aparición de complicaciones que puede presentar un paciente. Se establece en base a su edad, estado cardiovascular, comorbilidades, estado funcional general y pruebas de función pulmonar. La reseabilidad por su parte hace referencia a la posibilidad de realizar un tratamiento quirúrgico con intención curativa. Viene definido por la estadificación del tumor de acuerdo a la clasificación TNM, considerándose indicado en estadio I y II y en algunos casos seleccionado de estadio III^{52,54}.

El tratamiento quirúrgico con intención curativa está compuesto por la resección del parénquima pulmonar incluyendo el tumor primario y una disección de los ganglios linfáticos locoregionales.

La IASLC define como resección tumoral completa la que cumple los siguientes criterios⁵⁵:

- a) Márgenes de resección libres demostrados microscópicamente. Estos márgenes deben incluir los muñones de arterias, venas y bronquios, los tejidos blandos peribronquiales y cualquier margen periférico cercano al tumor o al resto del tejido resecado.
- b) Disección ganglionar sistemática en su forma más amplia, o bien disección ganglionar sistemática lóbulo-específica (tal como se describe más arriba). Las muestras deben incluir, al menos, seis ganglios, tres de las estaciones intrapulmonares y/o hiliares y tres de las mediastínicas, una de las cuales debe ser la subcarínica.
- c) No debe haber extensión extracapsular del tumor en los ganglios resecados de manera aislada o en los localizados en el margen del principal tumor pulmonar.
- d) El ganglio mediastínico extirpado más alto debe ser negativo

1. RESECCIÓN PULMONAR

En cuanto a la extensión de la resección pulmonar el procedimiento considerado estándar es la lobectomía. De tal forma que en pacientes con tumores en estadio I o II y que pueden tolerar una resección pulmonar, el procedimiento mínimo recomendado será la lobectomía⁵⁶.

A lo largo de la historia de la Cirugía Torácica, la evolución en el tratamiento quirúrgico del cáncer de pulmón se ha asociado a la progresiva reducción en la extensión de parénquima pulmonar resecado. Las primeras resecciones realizadas con el objetivo de tratar un cáncer de pulmón consistieron en la resección de un pulmón completo o neumonectomía realizadas por cirujanos que han sido referentes en la cirugía Torácica como Graham, que describió y desarrolló esta técnica en 1930⁵⁷.

A finales de los 50 y durante la década de los 60 la neumonectomía fue gradualmente remplazada por la lobectomía, que se convirtió en el procedimiento estándar a mediados desde entonces⁵⁸.

Los siguientes pasos hacia la preservación de parénquima pulmonar se dieron con el desarrollo de las resecciones en manguito que mediante técnicas de broncoplastia y angioplastia permiten preservar parénquima pulmonar, con unos mejores resultado en cuanto a morbilidad y supervivencia comparados con la neumonectomía^{59 60}.

El siguiente paso ha consistido en evaluar el posible papel de las resecciones pulmonares sublobares para el tratamiento del estadio I, comparando los resultados obtenidos con respecto a la lobectomía en términos de supervivencia. En 1995 se publicaron los resultados de un ensayo clínico que comparaba la lobectomía frente a resecciones sublobares en pacientes con estadio T1N0 encontrando un incremento del riesgo de recurrencia de un 75% y de la mortalidad es de un 30%⁶¹.

Tras este estudio la lobectomía continuó considerándose el tratamiento de elección, aunque numerosos estudios posteriores han tratado de evaluar si podrían conseguirse resultados equiparables en casos seleccionados⁵⁰.

En la actualidad dos importantes ensayos clínicos pretenden comparar la lobectomía frente a resecciones sublobares, en EEUU el ensayo clínico realizado por el 'Cancer and Leukemia Group B trial 140503' que compara lobectomía frente a resecciones limitadas (resección atípica o segmentectomía)⁶². Y el denominado 'Japan Clinical Oncology Group (JCOG) 0802 study'⁶³, que compara lobectomía frente segmentectomía.

A la espera de resultados definitivos las resecciones sublobares son recomendadas en los siguientes supuestos:

- En caso de lesiones inferiores a 2 cm detectadas en estudio de TAC con características radiológicas de lesión no solida o subsólida con componente ground glass y en los que el status N0 haya sido confirmado.
- En pacientes con estadio I y en el que la situación clínica del haga que puedan tolerar una intervención quirúrgica pero no una lobectomía, la resección sublobar (segmentectomía reglada o atípica) es preferible al tratamiento no quirúrgico^{47,56}.

2. DISECCIÓN GANGLIONAR

Otro aspecto de gran importancia en el tratamiento quirúrgico del cáncer de pulmón es la estadificación ganglionar intraoperatoria. La extensión ganglionar es un factor pronóstico clave para determinar la indicación de un tratamiento adyuvante, ES determinante para considerar una cirugía completa y un requerimiento esencial en el control de calidad de la cirugía^{47,64}.

En 1978 Naruke publicó un artículo de referencia en el que se propone por primera vez un mapa de los ganglios linfáticos loco-regionales en el cáncer de pulmón, en dicho trabajo se resalta la importancia pronóstica de describir la localización específica de las adenopatías⁶⁵.

Desde entonces se han publicado varias revisiones de este mapa ganglionar, habiendo existido importantes discrepancias en la nomenclatura utilizada entre países asiáticos y occidentales, hasta que en el 2009 la IASLC

estableció un mapa ganglionar como parte del proyecto de estadificación en la que se establece una definición anatómica precisa de las distintas estaciones ganglionares que es la empleada en la actualidad^{66,67}.

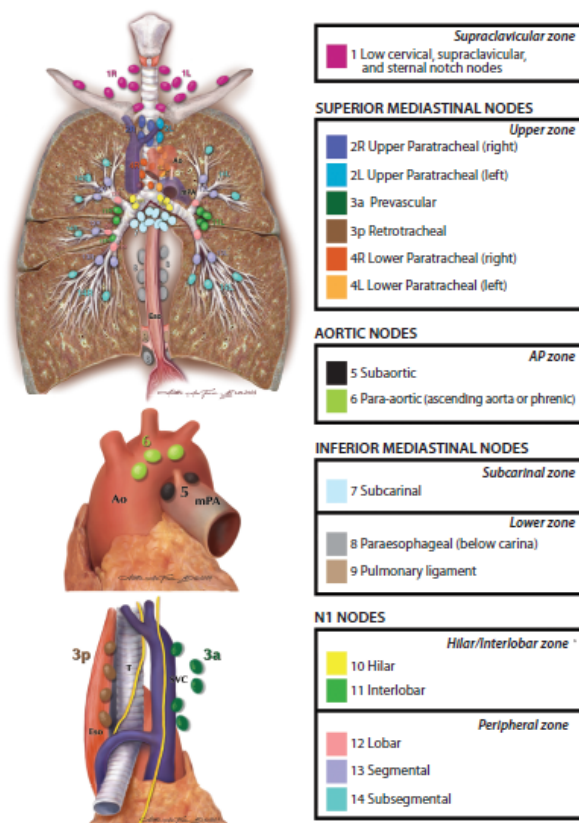


Figura 5. Mapa ganglionar de las estaciones y zonas propuestas por la IASLC

Otro aspecto de vital importancia lo constituye la extensión de la linfadenectomía. Esta ha de ser lo suficientemente exhaustiva para conseguir una correcta clasificación pero sin llegar a suponer un incremento excesivo del riesgo quirúrgico y de complicaciones o de la duración de la intervención. La guía de estadificación intraoperatoria de la ESTS⁶⁴ propone las siguientes definiciones sobre los métodos de evaluación ganglionar durante la cirugía:

1. *Biopsia ganglionar selectiva.* Consiste en biopsiar uno o varios ganglios de aspecto sospechoso. Estaría justificado solo para demostrar la afectación N1 o N2 cuando la resección no es posible (toracotomía exploradora).
2. *Muestreo.* Es la exploración mediante extirpación de ganglios, de un número preestablecido de estaciones ganglionares pulmonares y mediastínicas con un fin concreto. Muestreo sistemático: resección de estaciones predeterminadas por el cirujano.
3. *Dissección ganglionar sistemática.* Resección sistemática de todo el tejido mediastínico, incluyendo las adenopatías entre los límites anatómicos. En los tumores del lado izquierdo, para poder acceder a las estaciones

paratraqueales altas y bajas se debe liberar el ligamento arterioso para poder movilizar el arco aórtico. Se requiere un mínimo de 3 estaciones ganglionares (incluyendo siempre la subcarínica). Los ganglios deben identificarse y ser analizados histológicamente de forma separada. Además, se deben diseccionar las adenopatías hiliares e intrapulmonares.⁶⁸

4. *Dissección ganglionar sistemática lóbulo-específica.* Resección sistemática de todo el tejido mediastínico, incluyendo las adenopatías, dependiendo del lóbulo donde se localice el tumor⁶⁹. Este tipo de dissección selectiva es aplicable a carcinomas escamosos T1. Las áreas a explorar según el lóbulo afectado, siguiendo las descripciones de Naruke y las normas del Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de SEPAR⁴⁷, son:
5. *Dissección y examen histológico de los ganglios hiliares e intrapulmonares* (lobares, interlobares y segmentarios) y al menos tres de las siguientes estaciones ganglionares mediastínicas, según la localización lobar del tumor primario: a) lóbulo superior derecho y lóbulo medio: áreas 2R, 4R y 7; b) lóbulo inferior derecho: áreas 4R, 7, 8 y 9; c) lóbulo superior izquierdo: áreas 5, 6 y 7; d) lóbulo inferior izquierdo: áreas 7, 8 y 9. En total debería incluir 6 ganglios.
6. *Dissección ganglionar extendida.* Se define como la de los ganglios pulmonares y mediastínicos contralaterales, como complemento a la dissección ganglionar sistemática ipsilateral al tumor. Incluye la dissección cervical y generalmente se realiza mediante estereotomía media.

Se han realizado diversos estudios comparando los resultados obtenidos entre diferentes técnicas dissección ganglionar mediastínica. La dissección sistemática ganglionar ha demostrado conseguir una estadificación más fiable que el muestreo ganglionar^{64,70} sin embargo no ha conseguido demostrar ventajas en términos de supervivencia. Dos ensayos clínicos retrospectivos realizados hace más de 10 años no encontraron diferencias significativas comparando dissección ganglionar sistemática con el muestreo ganglionar sistemático.^{71,72} La recurrencia local fue algo inferior en el grupo de la dissección sistemática aunque las diferencias no fueron significativas. Otro ensayo clínico publicado en 2002 mostró ciertos beneficios terapéuticos de la dissección sistemática⁷³, sin embargo un posible sesgo metodológico en el que está implicado una posible migración de estadio durante el estudio, conocido como fenómeno de Will Rogers, hace que los resultados hayan de ser interpretados con cautela.

Tras estos estudios un ensayo clínico prospectivo multicéntrico llevado a cabo por el American College of Surgery Oncology Group (ACOSOG Z0030) se considera el trabajo referente en la actualidad y no ha encontrado diferencias en cuanto a supervivencia global o libre de enfermedad en estadio precoces de NSCLC.^{74,75} Concluye que si un muestreo ganglionar sistemático mediastínico e hilar es negativo, la dissección mediastínica no mejora la supervivencia.

3. ABORDAJE MÍNIMAMENTE INVASIVO

En lo referente a la vía de abordaje a lo largo de la historia de la Cirugía Torácica se han propuesto diferentes opciones para llevar a cabo una resección pulmonar. Entre otras la esternotomía media, la toracotomía o en los últimos años la cirugía videoasistida o cirugía VATS (de sus siglas en inglés: videoasisted thoracosopic surgery).

El abordaje estándar hasta mediados de los años 90 ha sido la toracotomía posterolateral, sin embargo el abordaje mínimamente invasivo ha ido adquiriendo un mayor protagonismo y desde finales de los 90 la cirugía videoasistida se ha ido generalizando en especial para el tratamiento quirúrgico de los estadios iniciales⁷⁶.

Varios estudios retrospectivos han demostrado que la lobectomía videotoracoscópica está asociada a un menor número de complicaciones⁷⁶⁻⁸⁰, un inferior porcentaje de transfusión y una menor estancia hospitalaria^{76,77,81,82}. Se han realizado varios meta análisis y revisiones sistemáticas en los que encuentran beneficios en los resultados a corto plazo (menor número de complicaciones, mortalidad perioperatoria y dolor) y a largo plazo con tasas de supervivencia por lo menos similares a las de las resecciones pulmonares abiertas⁸³⁻⁹⁰. Si bien en varios de estos trabajos se advierte que los resultados provienen en la mayoría de casos de estudios no randomizados, además de los posibles sesgos a muchos niveles que estos estudios pueden presentar^{85,90}.

Con todo lo anterior las recomendaciones de la ACCP (American College of Chest Physicians) concluyen que para pacientes con estadio clínico I el abordaje mínimamente invasivo como la videotoracosopia es preferible a la toracotomía para resecciones pulmonares anatómicas en centros con experiencia. (con un grado de evidencia 2C)⁵⁶.

1.6.2 TRATAMIENTO ADYUVANTE

Un número significativo de pacientes con CPNM sometidos a una supuesta resección curativa finalmente mueren por enfermedad recurrente. Con el objetivo de mejorar los resultados se ensayaron diferentes esquemas de tratamiento adyuvante y se han realizado varios ensayos clínicos tratando de probar beneficios.

El elevado porcentaje de recurrencias en estadios iniciales llevó a plantear nuevos esquemas de tratamiento en los que se incluye el tratamiento adyuvante tras la cirugía. Diversos estudios han tratado de demostrar los beneficios en términos de supervivencia aportados por diferentes regímenes de quimioterapia (QT) tras el tratamiento quirúrgico. Estudios iniciales realizados en los 90 mostraron que los diferentes regímenes no eran equivalentes y que debían evitarse agentes alquilantes en favor de regímenes basados en el platino⁹¹. Los resultados de los ensayos clínicos realizados, han demostrado beneficios del tratamiento adyuvante tras resección completa en el estadio II⁹².

Sin embargo no han conseguido demostrar con una suficiente evidencia un mejor resultado tras adyuvancia en pacientes con estadio I. Para el estadio IA no se encontraron beneficios, incluso algunos estudios apuntaban a peores resultados debido a efectos secundarios de la quimioterapia^{92,93}. Para el estadio IB los resultados han suscitado una mayor controversia, y aunque los resultados iniciales de algunos de ellos como el CALBG 9633 y el JBR10 apuntaban a potenciales beneficios, análisis posteriores con resultados a más largo plazo los cuestionan⁹³⁻⁹⁵.

De esta forma las actuales recomendaciones de la ACCP (American College of Chest Physicians) concluyen⁵⁶:

- Para pacientes con estadio patológico IA, IB sometido a resección completa se recomienda no utilizar tratamiento adyuvante fuera de un ensayo clínico (grado de recomendación 1B)
- Para pacientes con estadio patológico II sometido a resección completa y con buen performance status se recomienda quimioterapia adyuvante con un régimen basado en el platino (grado 1A)

1.7 RESULTADOS DEL TRATAMIENTO EN ESTADIOS PRECOCES DEL CPNM. VALORACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL, RECURRENCIA Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD.

1.7.1 SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE ENFERMEDAD

Los análisis de supervivencia tienen por objeto evaluar los resultados de los tratamientos y conocer e informar sobre el pronóstico de los pacientes con cáncer. La tasa de supervivencia expresa la proporción de pacientes que sobreviven del total de pacientes afectados por la enfermedad en un periodo de tiempo determinado. Esta tasa de supervivencia puede resumirse en curvas de supervivencia que muestran la evolución de las tasas de supervivencia en el tiempo.

Por su parte la tasa global de supervivencia corresponde al número de pacientes vivos al término del período de observación, con enfermedad o sin ella. Mientras que la supervivencia libre de enfermedad indica la tasa de pacientes que continúan vivos al final del periodo de seguimiento sin evidencia de enfermedad, ésta última refleja mucho mejor el éxito del tratamiento.

Los resultados en términos de SG en estadios iniciales se sitúan en torno al 60-80% para el estadio I y entre el 30-50% para el estadio II en función de los estudios consultados^{48,51,52}.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de la IASLC para la validación de la 7ª edición de la clasificación TNM, la supervivencia global para pacientes de según al estadio patológicos fue del 73% en estadio IA, IB: 58%; IIA, 46%; IIB 36%; IIIA 24%; IIIB 9%, y IV 13%⁴⁸.

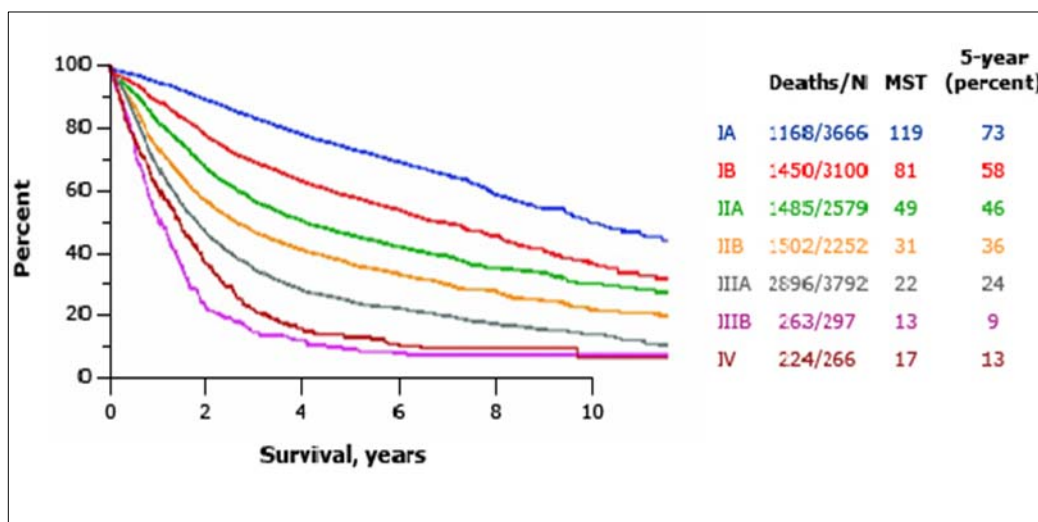


Figura 6 Supervivencia global expresada como media de supervivencia y supervivencia a los 5 años de acuerdo a los estadios patológicos propuestos en la 7ª Edición de la Clasificación TNM. (Groome et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. J Thorac Oncol. 2007;2(8):694-705.)

1.7.2 RECURRENCIA

De acuerdo a la definición del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (NCI), cáncer recurrente es aquel que reaparece tras un período durante el cual no podía ser detectado. Se considera que una recurrencia es la reaparición del cáncer en la misma localización del tumor original (primario) o a distancia tras haberse considerado al paciente libre de enfermedad.

Mientras que recidiva es la reaparición del tumor en la misma localización del tumor primario. (National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines).

Aunque la resección pulmonar se ha mostrado a lo largo del tiempo como la mejor alternativa terapéutica y con la que se consiguen las mejores tasas de supervivencia, nos seguimos encontrando unas cifras considerables de recidiva tras resección completa que oscilan entre el 35-50% en función del estadio⁹⁶⁻¹⁰².

Hasta un 80% de las recurrencias tienen lugar durante los dos primeros años tras la intervención¹⁰¹. Entre el 7-15% son loco-regionales^{96,97} y entre el 14 y el 23% ocurren a distancia^{101,103}.

Dado que la mayor parte se presentan en forma de metástasis a distancia los tratamientos de elección son la quimioterapia, la radioterapia o bien la quimio radioterapia concurrente. La resección quirúrgica se reserva para casos de recurrencia local seleccionados.

En los últimos años los avances en la cirugía mínimamente invasiva, las terapias dirigidas basadas en el análisis molecular y la radioterapia estereotáxica (SBRT) han conseguido mejorar de forma importante la supervivencia de estos pacientes, de ahí la importancia de una detección precoz de la misma.

1.8 FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES

Aquellos parámetros o características del paciente o tumor que predicen los resultados, generalmente la supervivencia, independientemente del tratamiento realizado se conocen como factores pronósticos^{104,105}. Mientras que factor predictivo es aquella característica del paciente o tumor que permite predecir la respuesta a un determinado tratamiento.

En estadios precoces de CPNM el elevado porcentaje de recurrencias ha hecho necesaria la identificación de factores que nos permitan detectar a pacientes que pese a encontrarse en estadios iniciales y haberse sometidos a una resección quirúrgica completa, presentan en contra de lo esperable a su estadio una recurrencia temprana de la enfermedad.

La identificación de factores que ayuden a detectar a estos pacientes con mayor riesgo de recurrencia podría contribuir a establecer indicaciones más precisas para el tratamiento adyuvante. Como hemos mencionado anteriormente la quimioterapia adyuvante ha demostrado mejorar los resultados en estadios II y III pero no el estadio I¹⁰⁶, probablemente por la falta de criterios adecuados para su indicación. De esta forma pacientes con buen pronóstico podrían no requerir de tratamiento adicionales a la cirugía, mientras que los pacientes con mal pronóstico podrían beneficiarse de un tratamiento adyuvante.

Numerosos factores clínicos, patológicos y quirúrgicos han sido propuestos en relación al pronóstico de pacientes intervenidos por CPNM. En los últimos años el desarrollo de la biología molecular y sus avances en el cáncer de pulmón, así como el desarrollo de las terapias dirigidas ha favorecido la investigación de un nuevo campo de biomarcadores. Pasamos a revisar los principales factores pronósticos que han sido propuestos hasta la fecha.

1.8.1 FACTORES CLÍNICOS

El factor pronóstico considerado hasta ahora de mayor relevancia es la estadificación TNM de la que hablamos anteriormente, con una supervivencia a los 5 años de un 73% para el estadio patológico IA frente a un 13% para el estadio IV^{46,48}. Además del estadio se han propuesto diferentes factores

pronósticos relacionados con parámetros clínicos como el performance status, la edad, el género o el tipo histológico^{107,108}.

En el subgrupo de pacientes con estadios precoces, con la finalidad de determinar que pacientes presentan un mayor riesgo de recurrencia, se han propuesto así mismo múltiples factores clínicos y patológicos como la edad¹⁰⁹, la diabetes^{98,110}, la extensión linfática mediastínica^{98,111,112} la histología no escamosa^{98,112} el valor CEA¹¹³, el valor SUV del PET, la invasión de la pleura visceral o la invasión vascular¹¹⁴ entre otros. Todos ellos se han asociado a un mayor riesgo de recurrencia en diversos estudios retrospectivos sin embargo no han conseguido establecer criterios aceptados en protocolos o guías para indicar un tratamiento adyuvante o un seguimiento más exhaustivo.

1.8.2 BIOMARCADORES

Los avances en el conocimiento de la biología molecular del cáncer de pulmón han liderado una revolución en el pronóstico y tratamiento del cáncer de pulmón¹¹⁵. La base molecular del cancer de pulmón es compleja y heterogenea y el descubrimiento de las alteraciones moleculares que ocurren a múltiples niveles (genéticos, epigenéticos y expresión proteica) y su significación funcional están ya teniendo y tendrán en el futuro un gran impacto en el enfoque diagnóstico, pronóstico y terapéutico del cáncer de pulmón^{115,116}.

Dichas alteraciones moleculares conducen al crecimiento tumoral y su detección puede implicar un mal pronóstico, además de proporcionar posibles dianas terapéuticas. La gran mayoría de las moléculas analizadas para este fin en el cáncer de pulmón, como en otras neoplasias, son productos de la expresión de determinados oncogenes o genes supresores.

La identificación y el desarrollo de marcadores tumorales en CP en esta última década ha sido exponencial, hasta ahora las mejor identificadas y definidas en los adenocarcinomas si bien el conjunto de alteraciones moleculares implicadas en el carcinoma escamoso esta despertando cada vez un mayor interés.

Entre las más ampliamente estudiadas con valor predictivo y pronóstico se encuentra las mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)^{112,117} y las translocaciones del gen ALK (Anaplastic Large Cell Lymphoma Gene) empleadas para la indicación de tratamiento con inhibidores de la tirosin quinasa en pacientes con cáncer de pulmón metastásico.

Pero hay una enorme diversidad genética en el cancer de pulmón, con un gran número de alteraciones y en este sentido las nuevas tecnologías de secuenciación han permitido pasar de estudiar de 1 o 2 genes a detectar simultáneamente el grado de expresión de miles de genes a la vez, identificando alteraciones somáticas de genomas o exosomas completos. En un reciente estudio a gran escala en el que se ha realizado la secuenciación de exosomas

se identificaron 727 genes mutados no descritos previamente en la literatura o en el COSMIC database¹¹⁸.

El empleo de nuevos tratamientos con inhibidores de la tirosin kinasa en base a la expresion de determinados biomarcadores como el EGFR han conseguido mejorar los resultados de pacientes con CPNM metastásico.

Al igual que ha ocurrido con los estadios avanzados se ha planteado la posibilidad de que los avances en biología molecular puedan así mismo mejorar los resultados en estadios iniciales, en los que no se dispone aún de biomarcadores con potencial aplicabilidad. De tal forma que podría identificar una subpoblación de paciente es estadios precoces con peores resultados, siendo indicadores o promotores de progresión tumoral y constituyendo además posibles dianas para terapias dirigidas¹⁰⁰. Entre ellos se encuentran biomarcadores pronósticos como el p53 o el KRAS. Biomarcadores predictivos y pronósticos tales como el EGFR, Her2, ERCC1, BRCA, ribonucleotido reductasa RRM1. Biomarcadores relacionados con el sistema inmune y firmas genéticas¹¹⁹ (Figura 7).

A continuación describimos dos genes de gran trascendencia en CPNM y describimos así como el desarrollo de firmas genéticas como potenciales biomarcadores en estos pacientes:

EGFR

EGFR es una glucoproteína transmembrana que cuenta un dominio citoplasmático que contiene el dominio tirosina quinasa.

Las mutaciones en el gen que codifica esta proteína conducen a la activación y amplificación intracelular de señales que llevan a la proliferación, invasión y migración de las células cancerígenas¹¹⁷ Se trata de genes receptores de Tirosina Cinasas (TK) que se encuentra expresado en más del 60% de los CPNM, convirtiéndose en una importante diana terapéutica.

Las mutaciones del EGFR han sido el centro de múltiples estudios analizando su papel pronóstico y predictivo en patients con CPNM.

Algunos estudios mostraron que la mutación del EGFR parecía tener un valor pronóstico favorable en la supervivencia de los pacientes con CPNM avanzado^{120 105,121} Así mismo en la actualidad es ampliamente conocido el valor predictivo de ciertas mutaciones del EGFR en la respuesta a tratamiento con inhibidores de la TK (ITK) en cancer de pulmón avanzado, con estudios entre otros el IPASS trial^{105,121-123}

El papel predictivo y pronostico del EGFR en estadios avanzados parece claro sin embargo su valor en estadios precoces es todavía controvertido. Diversos estudios han tratado de demostrar el papel pronóstico de la la mutación del EGFR en pacientes con cáncer de pulmón reseado.

Entre ellos un estudio retrospectivo realizado por Izar et al.¹²⁴ con 307 pacientes en estadio T1a-2aN0 tratados quirúrgicamente en el que encontraron que la mutación del EGFR se asociaba a una menor porcentaje (9.7% versus 21.6%; $p=0.03$) de recurrencias y una mayor mediana de SLE (8.8 versus 7.0 years; $p=0.0085$) y SG(98% versus 73%; $p=0.003$)¹²⁴. Sin embargo un posterior metaanálisis que analizaba el impacto de la mutación del EFGR en el pronóstico de pacientes con CPMN resecado no encontró que dicha mutación tuviera un papel pronóstico en estos pacientes¹²⁵.

Aunque diversos estudios retrospectivos han mostrado una mejor supervivencia en pacientes con mutación del EGFR¹²⁶, serán necesarios estudio prospectivos para poder llegar a conclusiones definitivas

p53

Se trata de un gen supresor que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 banda 13, y codifica una proteína nuclear de 53 Kd. La función del P53 en estado normal es la de regulación del ciclo celular ante un daño del DNA, por lo que se le ha denominado "guardián del genoma". Cuando el DNA se daña, el p53 se acumula en el núcleo, y es capaz de detener el ciclo celular en G1 antes que se duplique el DNA e iniciar su reparación. Si se repara la lesión el ciclo continuará, pero en caso contrario se inducirá la apoptosis de la célula mediante la expresión de genes como bax.

La alteración de la proteína P53 produce inestabilidad genómica, siendo las células incapaces de evitar la proliferación o activar la apoptosis, de manera que son capaces de acumular las mutaciones.

Se encuentra frecuentemente alterado en CPNM¹²⁷. Aunque se trata de un marcador de mal pronóstico bien establecido en otros tumores, en estadios precoces de CPNM aún es controvertido. En el ensayo clínico CALGB 9633 que comparaba tratamiento adyuvante frente a observación en paciente en estadio IB, se realizó un análisis de la expresión de p53 mediante técnicas de inmunohistoquímica. Dicha expresión estaba presente en el 47% de los tumores y encontraron una asociación de la misma a una peor SLE (hazard ratio [HR], 1.95; $p = 0.003$) y SG (HR, 2.30; $p = 0.0005$) en el análisis multivariante¹²⁸.

Así mismo en un metanálisis de 43 estudios que incluían a pacientes intervenidos con intención curativa encontró que la mutación o sobreexpresión de p53 era indicador de peor pronóstico en especial en pacientes con adenocarcinoma¹²⁹.

FIRMAS GENÉTICAS

Una firma genética consiste en la expresión de múltiples genes, proteínas o micro RNA que determinan un potencial riesgo de recidiva o la respuesta a ciertos tratamientos¹¹⁹. Los datos de estas firmas genéticas se representan en escalas de riesgo o subgrupos categóricos.

En un estudio desarrollado por Chen et al. se identificó una firma genética basado en 5 genes (DUSP6, MMD, STAT1, ERBB3, and LCK) que eran determinados empleando técnicas de real time PCR. Una puntuación desfavorable se asocia un incremento del riesgo de muerte (HR for death 1.92, $p = 0.03$)¹³⁰

Más recientemente Kratz propuso una firma genética con 14 genes usando técnicas PCR en pacientes con CPNM no escamoso y validó los resultados en una cohorte de pacientes en estadio I. La supervivencia a los 5 años fue del 71% en pacientes de bajo riesgo, 58% en riesgo intermedio y un 49% en pacientes de alto riesgo ($p = 0.0003$)¹³¹.

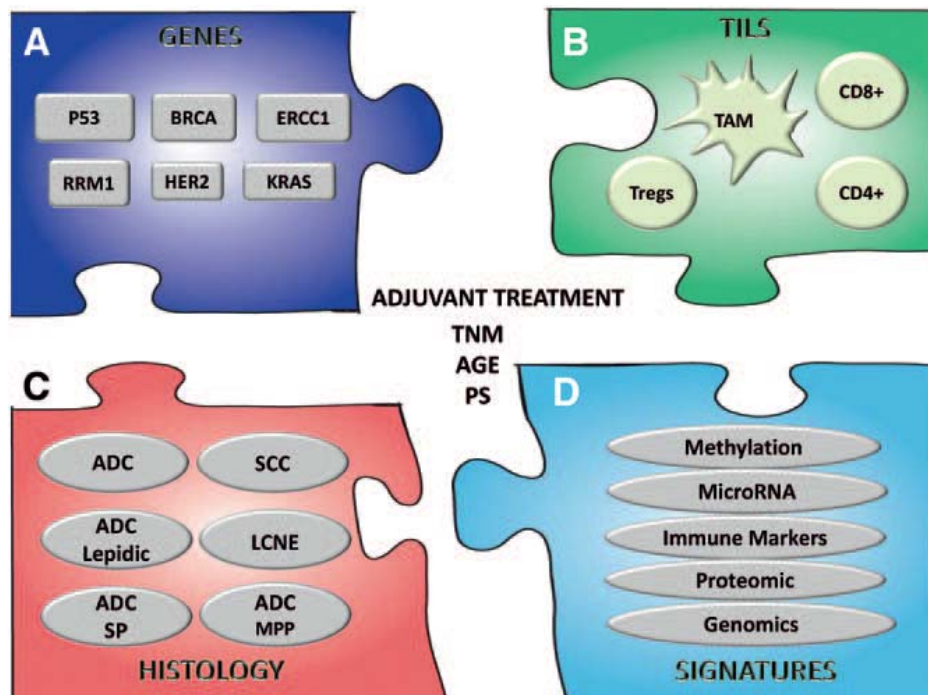


Figura 7 Potenciales biomarcadores en el CPNM.

(A): Análisis de genes aislados. (B) Infiltración por linfocitos en el tejido tumoral (TILs) incluidos macrófagos (TAM), linfocitos T CD4, CD8 y linfocitos T reguladores (Tregs); (C) subtipos histológicos; (D) firmas de grupos de genes, proteínas, patrones de metilación, MicroRNA etc. En el centro factores pronósticos como la estadiificación TNM, la edad o el performance status.

Tomado de Burotto et al. Biomarkers in early-stage non-small-cell lung cancer: current concepts and future directions. *J Thorac Oncol.* 2014;9(11):1609-1617.

1. 9 DISEMINACIÓN TUMORAL

El proceso de diseminación tumoral es una de las principales características de los tumores con capacidad invasiva. Las células de los tumores malignos tienen capacidad de diseminarse por vía sanguínea y/o linfática y anidar en otros órganos dando lugar al desarrollo de tumores secundarios. Este proceso, denominado metástasis, supone la principal causa de muerte debida al cáncer¹³².

El proceso metastásico puede ocurrir desde estadios muy tempranos del desarrollo del tumor; pudiendo desembocar posteriormente en el establecimiento de nuevos focos tumorales originando así la enfermedad metastásica¹³³.

Las etapas que dan lugar al desarrollo de la metástasis son las siguientes: en primer lugar, las células se desprenden del tumor primario penetran la membrana basal del tumor, infiltran el estroma subyacente, entran en microcirculación, bien vía linfática o vía sanguínea.

Las células viajan a través del sistema circulatorio (sangre o linfa) y se distribuyen pasivamente en órganos distantes deteniéndose en los vasos más pequeños. En determinadas ocasiones estas células pueden tener capacidad para extravasarse los capilares e invadir un órgano diana donde se adaptarán al microambiente para vivir en él¹³⁴.

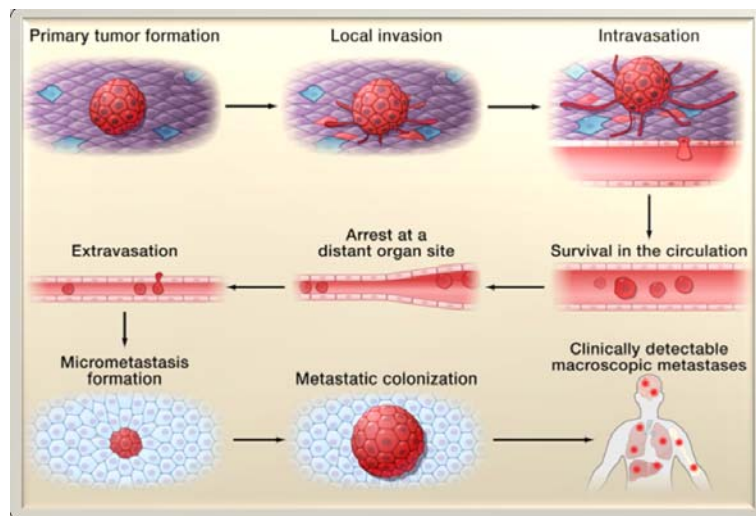


Figura 8 Proceso de diseminación tumoral. Tomado de SBae SY et al. Translationally Tumor Protein induces epithelial to mesenchymal transition and promotes cell migration, invasion and metástasis.ci Rep. 2015 Jan 27;5:8061

Durante el proceso metastásico, gran parte de las células diseminadas serán eliminadas por el sistema inmune y otra parte de éstas permanecerán en un proceso denominado estado de latencia; celular o tumoral¹³⁵.

Para que se produzca el crecimiento de la metástasis en el órgano diana, primero se debe vascularizar. En este proceso se rompe el equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos secretados por el tumor y el microambiente. Así las células tumorales con capacidad proliferativa formarán una micrometástasis y posteriormente metástasis detectables clínicamente.

En el proceso metastásico hay que distinguir entre dos conceptos fundamentales que implican la existencia de dos diferentes poblaciones tumorales:

- **Las células tumorales circulantes** (CTCs) que hacen referencia a las células que se pueden detectar en la sangre periférica de los pacientes y no son detectadas por métodos clínicos convencionales.
- **Las células tumorales diseminadas** (DTCs, del inglés disseminated tumor cells) haciendo referencia en este caso a las células que forman pequeñas agrupaciones de células tumorales (del inglés clúster) o micrometástasis y que se encuentran acantonados en determinados órganos, y que por lo general mantienen un estado de latencia hasta tener las condiciones adecuadas para su crecimiento^{136,137}.

Las células tumorales diseminadas que persisten después del tratamiento oncológico constituyen la fuente de recidiva de la enfermedad. La recidiva puede ser local, regional o a distancia. Se entiende como recidiva la aparición de células tumorales originarias del cáncer primitivo, en cualquier parte del organismo, tras haber realizado cirugía o cualquier modalidad de tratamiento primario con intención curativa. La recurrencia o recidiva sólo puede ocurrir cuando tras completar un tratamiento radical adecuado, permanecen células tumorales viables en el paciente.

Y dentro del proceso hay que distinguir a su vez múltiples pasos que podrán culminar con el desarrollo de nuevos focos metastásicos.

Los pasos para la formación de metástasis son los siguientes

A) Disociación e intravasación de las células tumorales.

Un epitelio normal mantiene su estructura gracias a las uniones intercelulares (uniones GAP y desmosomas) que mantienen a sus células íntimamente conectadas. Las células mantienen su estructura gracias a los filamentos de actina y filamentos intermedios de su citoesqueleto.

Las cadherinas son moléculas de adhesión, proteínas transmembrana dependientes de calcio. Para que las células tumorales puedan iniciar el proceso de invasión deberán romper las fuerzas que mantienen la adhesión celular y atravesar el epitelio vascular para pasar al torrente circulatorio.

La rotura de las fuerzas de unión se debe a la modificación en la adhesión. El cambio más importante es la pérdida de la adhesión mediada por E-cadherina. A su vez en el proceso intervienen proteasas, proteínas con actividad proteolítica, que permite a las células tumorales cruzar la matriz intersticial y llegar al sistema vascular. Las moléculas implicadas en el proceso son: las metaloproteasas de la matriz (MMP), el sistema activador del plasminógeno y su receptor.

La interleucina-8 (IL-8) es otra molécula clave en la progresión tumoral. Sus niveles se regulan por factores microambientales como la hipoxia, la acidosis, el óxido nítrico y la densidad celular, actuando como

factor mitogénico y angiogénica frente a estas situaciones. El nivel de expresión de IL-8 regula directamente la neovascularización inducida por el tumor, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis.

B) Angiogénesis.

El crecimiento del tumor primario y de la metástasis sólo es posible si se produce una neovascularización; que asegure la distribución de oxígeno y nutrientes al tejido, y un sistema excretor para eliminar los metabolitos de desecho.

El proceso de angiogénesis comienza con la degradación de la membrana basal que rodea los capilares locales, sigue con la invasión del estroma por las células endoteliales. Los nuevos vasos que se van formando muestran diferencias respecto a los normales: tienen arquitectura más desordenada e irregular, con áreas de hipoxia y acidosis. Las membranas de las nuevas células endoteliales son más permeables y los marcadores de superficie y las moléculas de adhesión son diferentes, esto permite la selección de dianas para terapias antiangiogénicas. Entre las moléculas implicadas cabe destacar el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

C) Diseminación tumoral linfática

Las células del tumor primario penetran en un vaso linfático, que carece de membrana basal y son transportadas por la linfa hasta un ganglio linfático donde proliferan formando una metástasis ganglionar linfática. La mayoría de las células tumorales que llegan al ganglio son destruidas por el sistema inmune y no pueden llegar a formar metástasis¹³⁸.

D) Diseminación tumoral sanguínea

Las células tumorales invaden los tejidos adyacentes al tumor primario hasta penetrar en la pared de algún vaso sanguíneo pequeño.

Cuando la célula tumoral alcanza el torrente sanguíneo tiene que superar varios obstáculos: la apoptosis y la actividad del sistema inmune. Las células tumorales escapan de la apoptosis porque experimentan alteraciones en las integrinas y moléculas implicadas en la señalización (proteínas reguladoras de apoptosis). Las células tumorales pueden enmascarar antígenos de superficie que son reconocidos por los linfocitos¹³⁹.

1.10 CÉLULA TUMORAL CIRCULANTE, CÉLULA TUMORAL DISEMINADA Y CÉLULA MADRE DEL CÁNCER

Existen muchas evidencias de que células tumorales del tumor primario ingresan en vasos linfáticos periféricos y en la circulación sanguínea en estadios

muy tempranos, durante el desarrollo del cáncer. Este proceso de diseminación depende en gran medida del origen celular, alteraciones genéticas y agresividad del subtipo de cáncer¹⁴⁰. Por este motivo algunos pacientes con una completa resección del tumor, por cirugía, con márgenes negativos, pueden mostrar células tumorales circulantes (CTCs) en sangre periférica y células tumorales diseminadas (DTCs) en nódulos linfáticos, medula ósea y en tejidos distantes u órganos. Consecuentemente las CTCs, tienen la capacidad de sobrevivir en el torrente sanguíneo y diseminar a sitios distantes, pudiendo persistir y contribuyendo a la metástasis o generando recaídas tras una supuesta cirugía curativa del tumor primario.

Con respecto a esto, un creciente número de evidencias experimentales, han revelado que las células progenitoras del cáncer pueden presentar propiedades relacionadas no sólo con la iniciación del proceso metastásico sino también poseer importantes funciones en el crecimiento tumoral, metástasis, resistencia al tratamiento y recaídas de la enfermedad oncológica. De hecho, se ha demostrado que la mayoría de los cánceres pueden proceder de la transformación maligna de las células madres/progenitoras inmaduras, residentes en tejidos o su progenie temprana, que posee alta capacidad de autorenovación y potencial de diferenciación aberrante ¹⁴¹(Mimeault & Batra, 2010a, 2010b) .

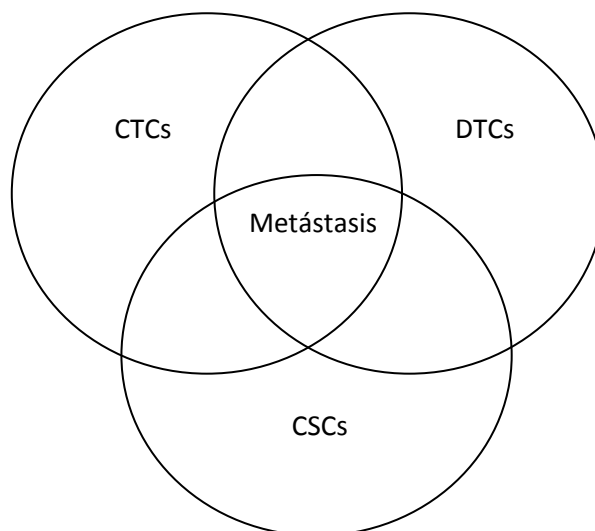


Figura 9. Representación esquemática de los tres grupos celulares que componen el proceso metastásico.

1.10.1 Células Tumorales Circulantes.

Las células tumorales circulantes, son células que circulan en la sangre de los pacientes con cáncer, y son originadas en el tumor primario o las respectivas metástasis. El descubrimiento de las CTCs, data de 1869 (Ashworth,

1869). Desde entonces se ha convertido en un campo de investigación, muy prometedor, ya que a partir de una sencilla muestra de sangre periférica se puede detectar el número de CTCs por volumen de sangre. La monitorización serial de las CTCs durante y luego del tratamiento, puede servir como un parámetro del grado de enfermedad circulante en el tiempo y dilucidar los mecanismos involucrados en los procesos de agresividad, metástasis y resistencia a las diferentes terapias. Teniendo en cuenta el origen de las CTCs, es de esperar que ellas presenten una heterogeneidad, respecto a sus fenotipo y genotipo, similar o mayor a una biopsia¹⁴². Cabe destacar que la mayor parte de las CTCs no poseen la capacidad de generar metástasis y ni siquiera sobrevivir por un tiempo prolongado, pero existen hallazgos recientes de que un grupo de ellas con marcadores específicos, tales como marcadores de células madre, pueden ser inductoras de metástasis¹⁴³ se ha visto además CTCs en división activa durante su paso por el torrente sanguíneo, en muestras de sangre de pacientes. Estos hallazgos sitúan a las CTCs, como un importante componente en la cascada metastásica y una herramienta potencial como biomarcador con valor pronóstico y predictivo. Las CTCs son también una importante diana en la terapéutica del cáncer, pudiendo ser consideradas en el futuro como masa tumoral a erradicar por medio de tratamientos especializados.

1.10.2 Relevancia Clínica de las CTCs

La identificación de nuevos y más importantes factores pronóstico y predictivos, es uno de los campos de investigación, más activos en la Oncología. Los actuales sistemas pronósticos (TNM, la caracterización molecular del tumor primario y los marcadores séricos) son en ocasiones insuficiente para una elección óptima de la terapéutica a seguir en los pacientes de cáncer. Un ejemplo de esto son los pacientes que no se consideran elegibles para terapias adyuvantes (debido a la falta de evidencia de enfermedad residual acorde a los métodos de estadiaje convencionales) que experimentan luego enfermedad recurrente y otros pacientes que son sometidos a terapias adyuvantes y solo tienen bajo riesgo de recurrencia de la enfermedad (es decir muy pocos de ellos pueden verse beneficiados de tratamiento complementario)¹⁴⁴. Por otra parte no existe ningún método fiable para predecir la sensibilidad a la mayoría de las terapias. En lo que respecta a los tratamientos adyuvantes, la eficacia solo puede medirse en ensayos clínicos a gran escala, después de un periodo de tiempo mayor a 5 años, lo que hace que el progreso en este campo sea extremadamente lento.

La detección de CTCs es una atractiva estrategia para el diseño de un tratamiento antitumoral individualizado, si se tienen en cuenta los siguientes aspectos:

- a) La presencia de CTCs es un paso necesario en la metástasis de tumores sólidos. En consecuencia, cualquier avance en el conocimiento de la biología de las CTCs podría dar lugar a avances en el desarrollo de nuevas dianas antitumorales y mejorar el pronóstico del paciente.

- b) Las CTCs podrían significar una herramienta pronóstica ideal, por su papel activo en la metástasis.
- c) Las células metastásicas pueden tener un perfil molecular diferente al tumor primario de origen, la sensibilidad a las drogas de la quimioterapia y las dianas terapéuticas pueden ser testadas en CTCs del mismo modo que se realiza en el tumor primario.
- d) Si se confirma el valor pronóstico, la detección de las CTCs podría ser de gran importancia para el seguimiento de la terapia adyuvante y neoadyuvante como así también para la identificación de pacientes que necesitarían un tratamiento adyuvante.
- e) Las CTCs son detectadas en sangre periférica, de una forma fácil y poco agresiva para el paciente en comparación con el uso de otras metodologías donde la enfermedad mínima residual podría estar presente y que si son altamente agresivas y difícilmente reproducibles. (medula ósea y ganglios linfáticos).
- f) Recientes avances en las tecnologías de detección y caracterización de CTCs podrían servir para caracterizar observando la evolución del tumor a tiempo real y utilizar esto para el diseño del tratamiento (Biopsia Líquida)¹⁴⁵

1.10.3 Métodos para la detección y separación de CTCs

Principios y requerimientos para la detección y reparación de CTCs

Cualquier metodología de detección, tienen que tener la capacidad de detectar un pequeño número de células tumorales entre millones de células sanguíneas. La mayoría de los métodos de enriquecimiento y detección para CTC utiliza una o más propiedades de las CTCs, que las distinguen de las células normales de la sangre:

- a) Propiedades biológicas: Las células son reconocidas a partir de la expresión de proteínas estructurales y de superficie, presencia de mutaciones, expresión de genes específicos, viabilidad y capacidad de invasión.
- b) Propiedades físicas: Tamaño, densidad, carga eléctrica y deformabilidad.

La propiedad biológica de uso más extendido, se encuentra en la expresión de proteínas, tales como la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y citoqueratina (CK) entre otros. No obstante, como hemos visto anteriormente, estas proteínas pueden perderse en el proceso de diseminación (EMT), perdiendo así la capacidad de detectar las CTCs que no expresen estas proteínas de tipo epitelial. Este cambio de marcadores en el proceso EMT justifica, en gran medida, la utilización de metodologías que se basan en las propiedades físicas de las CTCs. La propiedad física más utilizada para separar CTCs es el mayor tamaño que existe en estas, comparado con las células normales de la sangre. Aunque existe el inconveniente de que el

tamaño de las CTCs es también variable (entre 4 y 30 μm) con lo que estos métodos dejarían escapar las CTCs con tamaños similares a leucocitos.

Métodos inmunológicos

Los métodos por lo general consisten en un enriquecimiento previo, por lo general por gradiente de densidad, para obtener células nucleadas, que tras ser inmunomarcadas serán visualizadas mediante microscopía¹⁴⁶. La baja concentración de las CTCs ha provocado la realización de metodologías donde se utilizan doble enriquecimiento, por gradiente de densidad y posteriormente por selección inmunomagnética¹⁴⁷.

La tecnología del CellSearch ha automatizado el enriquecimiento inmunomagnético y el marcaje de las CTCs¹⁴⁸. Con esta tecnología las CTCs son enriquecidas con anticuerpos contra EpCAM unidos a ferrofluidos magnéticos y a continuación las células son teñidas para CK y se realiza una contra tinción de CD45 (antígeno leucocitario común) para evitar falsos positivos.

Recientes plataformas de microfluídica, como es el CTC chip. Utilizan anticuerpos contra EpCAM que se encuentran recubriendo micro columnas que son atravesadas por un flujo laminar de sangre total. Otro método aún más novedoso es CTC-Chip. Este método combina la separación por tamaños, por densidad y por separación inmunomagnética al tiempo que la sangre total viaja a través de un chip sometido a un campo magnético¹⁴⁹. Con la aparición de sistema llamado escaneo de fibra óptica (FAST) se puede detectar 300.000 células por segundo, tras haber sido reconocidas por anticuerpos conjugados con un fluorocromo¹⁵⁰.

Separación por tamaño

En cuanto a la separación por tamaños, existen muchos sistemas sencillos de separación de CTCs que utilizan membranas porosas¹⁵¹. Entre ellos el sistema ScreenCell que en tan solo 10 minutos separa las CTCs de mayor tamaño del resto de células sanguíneas.

2. HIPÓTESIS

El cáncer de pulmón representa la principal causa de muerte atribuida a cáncer a nivel mundial. Las variantes no microcíticas representan más del 80%.

La resección quirúrgica constituye el tratamiento de elección del cáncer de pulmón no microcítico y a pesar de que con la cirugía se consiguen las mejores tasas de supervivencia, el alto porcentaje de recidivas incluso en estadios iniciales y tras resección completa ha llevado a plantear la necesidad de investigar nuevos factores pronósticos.

Dado que la cirugía ha demostrado ser eficaz cuando el tumor puede ser completamente resecado, el elevado número de recurrencias obliga a pensar que un considerable porcentaje de estos pacientes ya tenían enfermedad generalizada en forma de micrometástasis o metástasis ocultas.

En la actualidad es conocido que para que llegue a producirse una metástasis, se requiere que un grupo de células procedentes del tumor primario sean capaces de desprenderse del mismo, atravesar la membrana basal, alcanzar el torrente sanguíneo y sobrevivir en él, alcanzando finalmente otros órganos donde darán lugar a las metástasis. A estas células tumorales que pueden aislarse en sangre periférica es a lo que denominamos célula tumoral circulante (CTCs).

El origen de la recurrencia local o de la diseminación metastásica podría relacionarse con la presencia de estas células tumorales circulantes, que son capaces de desprenderse del tumor primario ya en estadios iniciales.

La detección por tanto de estas CTCs antes y después de la intervención podría constituir un factor de mal pronóstico asociado a un mayor riesgo de recurrencia precoz y la base para plantear nuevas estrategias de tratamiento.

En un intento por mejorar los resultados de estos pacientes en estadios iniciales, se han planteado diversos esquemas de quimioterapia adyuvante. Sin embargo ninguno de ellos ha conseguido demostrar beneficios en términos de supervivencia en el estadio I.

La detección de estas CTCs podría constituir una indicación más precisa de tratamiento adyuvante en estadios iniciales. Así mismo su monitorización postoperatoria supondría una herramienta útil en el seguimiento de estos pacientes y en la evaluación de la respuesta al tratamiento adyuvante, valorando el incremento o disminución del número de CTCs. Ello permitiría finalizar tratamientos ineficaces precozmente y ensayar otras modalidades terapéuticas.

Diversos estudios han demostrado el papel clave que la detección de células tumorales circulantes tienen en el proceso metastásico y el papel pronóstico y predictivo que la determinación de estas CTCs puede tener en diferentes tumores de origen epitelial, como en el cáncer de mama, colon o próstata.

Sin embargo en el cáncer de pulmón, aún son pocos los estudios al respecto, especialmente en pacientes con estadios iniciales donde la detección

de CTCs supone un reto aún mayor. En lo que respecta al cáncer de pulmón varios grupos han investigado el valor pronóstico de la detección de CTCs en pacientes con estadios avanzados sometidos a tratamiento quimioterápico. Sin embargo son escasas las publicaciones en estadios iniciales sometidos a resección quirúrgica, sus resultados apuntan a un posible valor pronóstico de la detección de CTCs, requiriéndose de nuevos estudios para confirmar dichos hallazgos.

Junto a la detección y enumeración ha sido demostrada la importancia de la caracterización de estas CTCs. Se ha comprobado que las CTCs presentan una gran heterogeneidad, y que sólo algunas de ellas con particulares características serán capaces de dar lugar a metástasis, la caracterización de este subgrupo será un aspecto fundamental en futuras investigaciones sobre CTCs. Además su análisis molecular permitirá detectar alteraciones genéticas en las CTCs que pueden corresponderse o no con las presentes en el tumor primario, y que pueden tener implicaciones fundamentales en la aparición de resistencias al tratamiento, en el pronóstico y en la aparición de recidivas.

El estudio de las CTCs supone un importante avance en el conocimiento del proceso metastático con importantes implicaciones en la práctica clínica ya que ayudaría a identificar a pacientes con un alto riesgo de recidiva hasta ahora no detectados por los factores pronósticos habituales y en los que podría indicarse la necesidad de tratamientos alternativos. La caracterización de las CTCs permitiría además disponer de un perfil fenotípico y molecular de las mismas que ayudaría a evaluar la aparición de resistencias al tratamiento y por tanto la posibilidad de ofrecer al paciente un tratamiento individualizado en base a factores pronósticos mucho más precisos que los empleados tradicionalmente.

Basándonos en lo anteriormente expuesto pretendemos demostrar que la detección y caracterización de CTCs en sangre periférica de pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico de un cáncer de pulmón no microcítico se asocia a un peor pronóstico, identificando a pacientes que pese a encontrarse en estadios iniciales presentan un mayor riesgo de recurrencia. A estos pacientes podría ofrecerse además nuevos esquemas de tratamiento adyuvante que mejoren los resultados de supervivencia.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general consiste en analizar el valor pronóstico de la detección y caracterización de CTCs en pacientes con tratamiento quirúrgico radical de un cáncer de pulmón no microcítico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si es posible la detección de células tumorales circulantes (CTCs) de origen epitelial en la sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico sometidos a resección pulmonar.
2. Caracterizar fenotípicamente las CTCs aisladas.
3. Determinar si la presencia de CTCs antes y después de la cirugía se asocian con la aparición de recurrencias.
4. Analizar la influencia pronóstica de la detección de CTCs antes y después de la intervención en la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad de estos pacientes
5. Determinar el valor pronóstico de la caracterización fenotípica de las CTCs en pacientes con cáncer de pulmón resecado.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO

Estudio observacional prospectivo de cohortes en pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa de un cáncer de pulmón no microcítico a los que se realizaron dos determinaciones de CTCs antes de la intervención y un mes tras la cirugía.

4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón no microcítico sometidos a tratamiento quirúrgico con carácter radical en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada, que no habían recibido quimioterapia ni radioterapia previamente y que se ajusten a los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

4.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes con cáncer de pulmón no microcítico a los que se realice una resección quirúrgica completa de acuerdo a los criterios establecidos por el Comité de estadificación de la IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer):
 1. Márgenes de resección libres demostrados microscópicamente.
 2. Disección ganglionar sistemática en su forma más amplia, o bien disección ganglionar sistemática lóbulo-específica.
 3. No debe haber extensión extracapsular del tumor en los ganglios resecados de manera aislada o en los localizados en el margen del tumor pulmonar.
 4. El ganglio mediastínico extirpado más alto debe ser negativo.

- Que la resección pulmonar haya sido anatómica, considerando como tal la realización de una lobectomía, bilobectomía o neumonectomía. Las segmentectomías típicas se contemplan en pacientes en los que la limitación funcional respiratoria contraindique la lobectomía y en pacientes con estadio T1NOMO, tumores sincrónicos o tumores del sulcus superior.
 - Edad superior a 18 años.
 - Performance status 0,1,2.
 - Consentimiento informado.

4.2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes a los que se haya realizado una resección atípica.
- Pacientes con resección incompleta del tumor.
- Pacientes que hayan recibido quimioterapia o radioterapia previa.
- Pacientes con historia previa de neoplasia maligna en los 5 años anteriores al estudio.
- Pacientes que mueran en el postoperatorio.
- Pacientes con criterios de irresecabilidad:
 - o Derrame pleural tumoral, definido por la presencia de citología del líquido pleural positiva para células tumorales y/o biopsia pleural con infiltración tumoral efectuada con aguja transtorácica o por toracoscopia.
 - o Afectación neoplásica del nervio recurrente.
 - o Invasión extensa de pared torácica o de tráquea.
 - o Invasión extensa del cuerpo vertebral, del foramen neural, de los vasos subclavios o síndrome de Horner.
 - o Síndrome de vena cava superior.
 - o Metástasis a distancia a excepción de metástasis única en el sistema nervioso central tratable. Metástasis en adenopatías mediastínicas en estaciones consideradas como N3.
- Pacientes con criterios de inoperabilidad:
 - o Estado clínico general igual o inferior al 50% del grado de actividad de la escala Karnofsky no reversible (ECOG III-IV)
 - o Enfermedad asociada severa e incontrolable que limite seriamente y de forma permanente o prolongada las capacidades psíquicas o físicas más básicas del paciente o cuyo pronóstico sea fatal a corto plazo.
 - o Cardiopatía grave o incontrolable. Infarto agudo de miocardio (IAM) en las 6 semanas previas a la cirugía. Puede demorarse la cirugía 6 semanas o ser operado tras tratamiento de revascularización coronaria.
 - o Los pacientes con IAM durante los 6 meses previos a la cirugía o intervenidos de cirugía de revascularización coronaria hace más de 5 años, precisarán evaluación cardiológica.
 - o Rechazo del paciente del tratamiento quirúrgico solo o combinado.

- Funcionalismo respiratorio limitado: valores de FEV1 y DLCO predichos postoperatorios inferiores al 40% y con prueba de esfuerzo también afecta (VO2 max. por debajo de 10 ml/min/kg.)

4.3 VARIABLES

4.3.1 Variables Independientes

- Demográficas: edad (años), sexo: varón, mujer.
- Calidad de vida del paciente de acuerdo a la escala ECOG.
- Tabaquismo: Nunca, exfumador (con consumo acumulado superior a 20 paquete año), fuma en la actualidad.
- Comorbilidad:
 - Respiratoria: se considera antecedente de EPOC (con signos clínicos y espirométricos compatibles), antecedentes de TBC, de enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa, presencia de atelectasia o de neumonitis
 - Cardiovascular: se consideran antecedentes personales de cardiopatía (cardiopatía isquémica, valvulopatía, arritmia) HTA, vasculopatía periférica
 - Endocrina: diabetes mellitus. Otras.
 - Neurológica: secuelas de ACV. Síndrome miasteniforme. Otras.
- Fecha de la cirugía.
- Abordaje quirúrgico: considerando si se realizó una toracotomía posterolateral, abordaje VATS, toracotomía lateral u otro.
- Hemitórax intervenido: derecho o izquierdo.
- Tipo de resección: distinguiendo resección atípica, segmentectomía, lobectomía, bilobectomía, neumonectomía o combinación de varios tipos de resecciones. Resección ampliada: pacientes a los que se realizó una exéresis pulmonar ampliada a otras estructuras torácicas, incluyendo resecciones de pleura parietal, pared costal, diafragma, pericardio, columna vertebral, esófago, manguito bronquial, manguito vascular pulmonar, cava , aorta, otros.
- Histología: de acuerdo al informe de anatomía patológica distinguiendo: Epidermoide, adenocarcinoma, adenoescamoso, indiferenciado de células grandes, pobremente diferenciado, otro.

- Tamaño tumoral: tamaño en centímetros del tumor primario medido en la pieza quirúrgica.
- Estadio patológico: de acuerdo a la séptima clasificación TNM de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC)
- Mortalidad postoperatoria: definida como aquella ocurrida dentro de los 30 primeros días siguientes a la intervención o durante la estancia hospitalaria. Fecha de muerte. Causa de muerte: de origen cardiovascular, de origen respiratorio, otros.
- Tratamiento adyuvante: si se ha realizado algún tipo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia tras la cirugía.
- Tiempo de seguimiento: tiempo transcurrido desde la intervención hasta la fecha de finalización del seguimiento.
- Valor CTC1: presencia y niveles de CTCs basal antes de la cirugía.
- Valor CTC 2: presencia y niveles CTCs un mes tras la cirugía.
- Valor CTCsEGFR1: presencia y niveles de CTCs que expresan EGFR en la primera determinación
- Valor CTCsEGFR2: presencia y niveles de CTCs que expresan EGFR en la primera determinación

4.3.2 Variables Dependientes

- Estado: estado del paciente al final del seguimiento. (vivo o muerto)
- Supervivencia global: porcentaje de pacientes vivos al final del periodo de seguimiento.
- Supervivencia libre de enfermedad: tiempo después del tratamiento quirúrgico durante el cual un paciente sobrevive sin signos o síntomas de cáncer.
- Recurrencia locorregional o a distancia: definida como la reaparición del tumor en el pulmón o en otro órgano respectivamente.

4.4 PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Estudio observacional prospectivo de cohortes en el que se incluyen a pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico radical de un cáncer de pulmón no microcítico intervenidos entre noviembre 2012 y febrero 2015. A dichos

pacientes se les realizó dos determinaciones de CTCs, antes de la cirugía y al mes de la intervención y fueron posteriormente remitidos a revisiones periódicas habituales en estos pacientes. El estudio obtuvo la autorización del Comité Ético Hospitalario.

El tratamiento quirúrgico incluye la resección pulmonar del tumor junto a estadificación ganglionar mediastínica. La exéresis pulmonar realizada fue una lobectomía pulmonar (Figura 10) en todos los casos en que la extensión del tumor y la operabilidad del paciente lo hizo posible, o bien bilobectomía o neumonectomía si el tamaño o localización del tumor así lo requirió. La segmentectomía se realizó en aquellos casos en que las pruebas de función pulmonar no permitían realizar una lobectomía. Para la estadificación ganglionar mediastínica el procedimiento de elección fue disección ganglionar sistemática lóbulo-específica o el muestreo ganglionar sistemático.



Figura 10. Pieza de lobectomía pulmonar en un caso de un carcinoma epidermoide en LSD

La indicación de cirugía se estableció en una Sesión Multidisciplinaria de acuerdo al estadio y a los criterios de operabilidad y resecabilidad expuestos anteriormente. Algunos de estos pacientes recibió un tratamiento oncológico adyuvante a la cirugía en función de estadio patológico.

Los controles para el estudio se realizaron coincidiendo con las revisiones que habitualmente se realizan a estos pacientes antes de la cirugía y durante el seguimiento.

Los datos relativos a cada una de las variables se recogerán de forma prospectiva en una ficha de recogida de datos creada a tal efecto para este estudio. La recogida de datos se hizo siguiendo el siguiente protocolo:

- **Estudio inicial:** En la Consulta Externa de Cirugía Torácica se llevará a cabo la anamnesis y exploración física del paciente. Se entregó una hoja informativa sobre el propósito y protocolo del estudio, firmándose el Consentimiento Informado diseñado al respecto en caso de conformidad. Se llevó a cabo la apertura de la ficha de recogida de datos introduciendo los datos referentes a las variables demográficas, la calidad de vida del paciente de acuerdo a la escala ECOG, comorbilidad y función pulmonar.

- **Primera determinación:** Antes de la intervención se llevó a cabo una extracción de sangre periférica para realizar un hemograma, bioquímica y coagulación precisos para el estudio preoperatorio y para obtener la primera recogida de muestras para CTCs: CTCs iniciales (CTC1) de acuerdo al procedimiento explicado en metodología para determinación de CTCs en el siguiente apartado.
- **Procedimiento quirúrgico:** La resección quirúrgica se realizó en el quirófano de Cirugía Torácica. Al finalizar la intervención y en el mismo quirófano se obtuvieron muestras de la pieza quirúrgica para el estudio genético y molecular del tumor primario.
- **Segunda determinación:** En la Consulta Externa de Cirugía Torácica y coincidiendo con la primera revisión entre las 3 y 6 semanas tras la intervención, realizándose una anamnesis y exploración física del paciente. Y valorando una radiografía de tórax reciente. Se llevará a cabo una extracción de sangre periférica para realizar un control analítico con hemograma y bioquímica y recogida de muestras para segunda determinación de CTCs (CTC2)
- **Determinación de la necesidad del tratamiento adyuvante:** En este momento y con los resultados de la estadificación patológica se determinará la necesidad de tratamiento adyuvante.
- **Control periódico:** Cada 3-6 meses con al menos un TC torácico y abdominal al año.

4.5 DETERMINACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES CON FENOTIPO EPITELIAL POSITIVAS PARA CITOQUERATINA

4.5.1 Recogida de muestras y análisis de la muestra

A cada paciente se le extrajeron 20 ml de sangre periférica (2 muestras de 10ml cada una) previa firma de consentimiento informado, en los momentos especificados anteriormente. Las muestras sanguíneas fueron recogidas en tubos heparinizados CellSave® (Veridex, Johnson & Johnson Company, LLC) y procesadas dentro de las 72 horas siguientes a su extracción de acuerdo con el protocolo establecido por nuestro grupo (Gaforio, Serrano et al. 2003), (Nadal, Fernández et al. 2012). Para su transporte se adoptaron las medidas de bioseguridad, siguiendo el plan general de prevención de riesgos laborales del Centro remitente.

Simultáneamente a la determinación de los pacientes, se realizaron controles negativos con sangre de donadores sanos sin relación consanguínea

con los pacientes. Estas muestras se emplearon como controles negativos con la finalidad de detectar posibles falsos positivos. Se obtuvo el consentimiento de todos los voluntarios sanos. Todas las muestras son identificadas con un código para preservar la confidencialidad de los sujetos donantes, según normativa vigente.

4.5.2 Líneas celulares de cáncer de pulmón y fiabilidad del método

Las líneas celulares de cáncer de pulmón utilizadas en este estudio, fueron obtenidas de la colección europea de cultivos celulares (ECACC, Salisbury, UK). Las líneas utilizadas fueron: HT29, T1975 en los experimentos de recuperación de células, analizamos muestras control con 10, 5 y 1 célula. Las células tumorales fueron añadidas a 10ml de sangre venosa de voluntarios sanos, cada muestra control fue realizada por triplicado. Los controles fueron procesados de igual forma que los pacientes como se explicará en el siguiente punto.

4.5.3. Procesamiento de la muestra

El procesamiento de la muestra incluyó:

1. Enriquecimiento por gradiente de densidad
2. Permeabilización y fijación
3. Selección inmunomagnética
4. Fijación en portaobjeto por centrifugación
5. Tinción cromogénica con Fast Red y Hematoxilina

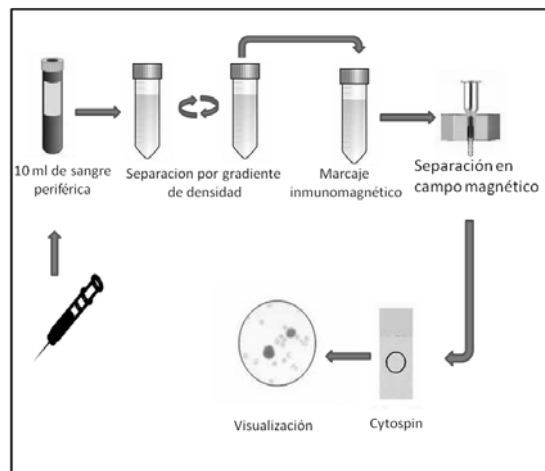


Figura 11. Esquemas del proceso de aislamiento de CTCs y fijación

Enriquecimiento por gradiente de densidad

10ml de muestra son diluidas con 5 ml de PBS, luego se deposita la mezcla cuidadosamente sobre 10 ml de una solución de 1,119 g/ml de densidad denominada Histopaque®1119(sigma). Se centrifuga a 700 g durante 40 minutos a temperatura ambiente y sin la utilización de freno.

Luego de la centrifugación, la muestra queda dividida en tres fases, una fase de glóbulos rojos, de mayor densidad que el Histopaque®, una fase de Histopaque y una fase de plasma sanguíneo. Entre estas dos últimas fases se encuentran las células blancas de la sangre, conjuntamente con las CTCs. Se recolectan esta capa de células y se las deposita en un tubo para su procesamiento.

Permeabilización y fijación.

Las células son lavadas con PBS y centrifugando a 350 g durante 10 minutos, para eliminar el Histopaque® residual del paso anterior. El pellet se resuspende en Buffer de dilución (Miltenyi, Biotec), se agrega el permeabilizante y se deja actuar durante 5 minutos. A continuación se agrega el reactivo fijante y se lo deja actuar durante 30 minutos. Por último se centrifuga a 350 g durante 10 minutos y se elimina el sobrenadante.

Selección inmunomagnética

Las células son resuspendidas en una solución denominada Cell Stain (Miltenyi Biotec) y las agregaciones inespecíficas del anticuerpo eliminadas mediante un reactivo de bloqueo de la fracción fc de las inmunoglobulinas (Blocking fc Miltenyi Biotec). Posteriormente las células son incubadas con un anticuerpo anticitoqueratina (Clon CAM5.4) conjugado con macropartículas magnéticas (Miltenyi Biotec). Se incuban 45 minutos y luego se añade un anticuerpo pancitoqueratina que reconoce las citoqueratinas 7/8/18/19 unido al fluorocromo FITC y se deja actuar 15 minutos más. Una vez incubado se procede a realizar un lavado con 5 ml de CellStain centrifugando a 350 g durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se vuelve a incubar con un anticuerpo secundario dirigido contra FITC unido a la enzima alcalina fosfatasa. Tras la incubación de 15 minutos la muestra se pasa a través de unas columnas que están sometidas a un campo magnético (figura 12). Las células positivas para la expresión de citoqueratinas (CK) quedarán retenidas en dicha columna. Las células son recogidas de la columna mediante el uso de un embolo y la incorporación de 500 microlitros de PBS.

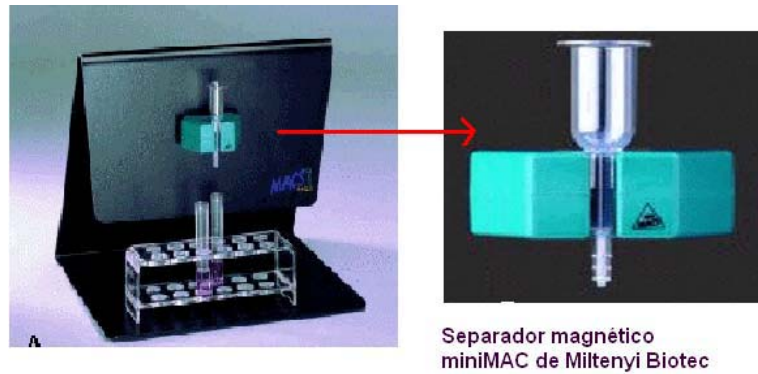


Figura 12. Separador magnético

Fijación en Portaobjeto

La muestra es colocada en una citocentrífuga (Hettich. Germany) y centrifugada a 1800 rpm durante 15 minutos. Al finalizar la centrifugación se extraen los portaobjetos y se dejan secar a temperatura ambiente para su posterior tinción.

Tinción Cromogénica

Se realiza un círculo, alrededor de las células fijadas, con lápiz hidrofóbico. Los cristales son incubados en PBS durante 15 minutos a fin de rehidratar la muestra. 100 ul de solución de FastRed Napthol resuspendido en tris-Clorhidrico es depositado sobre la muestra. Se incuba en cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se lava con PBS durante 5 minutos en jarra Coplin. Finalmente se coloca una gota de hematoxilina sobre el porta, se deja actuar 30 segundos y se lava rápidamente en agua destilada. La muestra es visualizada bajo microscopio convencional. Las células positivas para citoqueratina, presentaran un fuerte color rojo.(Figura 13)

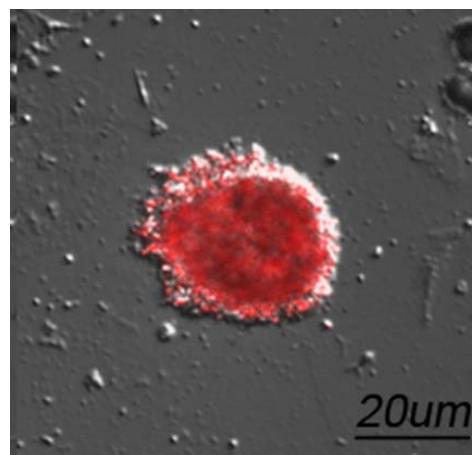


Figura 11. Célula tumoral circulante teñida con tinción cromogénica

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de las principales variables de estudio. Para las variables cuantitativas se calculó la media y desviación típica o mediana y percentiles, según la normalidad de los datos. Para las variables cualitativas se obtuvieron las frecuencias absolutas y relativas, representando los datos en tablas y gráficos. Se comprobó si los datos se ajustaban a una distribución normal mediante el test de Shapiro Wilk, con el fin de determinar si posteriormente se realizarían pruebas paramétricas o no paramétricas.

La detección de CTCs se analizó como una variable cualitativa binaria (presencia o ausencia) y como una variable continua. La presencia de 1 CTC por cada 10 mililitros de sangre se considera resultado positivo, de acuerdo con el límite de detección analítica indicado en nuestro ensayo.

Las variables categóricas fueron comparadas por la prueba exacta de Fisher's. Las variables continuas se compararon mediante el test de t-Student o ANOVA.

La supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad así como los intervalos libres de recidiva local y a distancia son computadas desde la fecha de la exéresis quirúrgica. Se consideran censurados los pacientes que en el momento de la finalización del estudio se encuentran vivos sin enfermedad o aquellos que fallecen sin evidencia de recidiva tumoral.

Se realizó un análisis de supervivencia por el método de Kaplan-Meier y se estableció una correlación entre la supervivencia y la presencia o ausencia de CTCs, además de las variables analizadas más relevantes. Se comparó la supervivencia entre los distintos grupos con el método de Log-Rank.

Para estudiar la asociación de la probabilidad de supervivencia con distintas variables predictoras, cualitativas y cuantitativas, se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox, univariante primero, y multivariante a continuación. El modelo de Cox relaciona el riesgo relativo de muerte o de aparición de un evento, con los diferentes factores pronósticos seleccionados y calcula la relación de riesgos (Riesgo Relativo o Hazard Ratio) y el intervalo de confianza del 95% para cada una de estas variables.

El nivel de significación para todos los contrastes fue de 0.05.

El software utilizado para el análisis estadístico ha sido el programa IBM-SPSS Statistics 19.

4.7 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Al tratarse de un estudio de cohortes que requiere además de un periodo de seguimiento prolongado, las pérdidas en el seguimiento pueden dar lugar a un sesgo de selección. El diseño del estudio se ha realizado de tal forma que el

paciente no tenga que realizar ninguna visita ni ser sometido a ninguna exploración o intervención adicional. De esta forma se conseguirán minimizar posibles pérdidas en el seguimiento. Así mismo en el cuestionario inicial se recogen datos de filiación que permiten contactar mediante la dirección o número de teléfono con el paciente. En caso de abandono se recogerá información clave sobre el paciente.

Para el control de posibles factores de confusión se realizará un análisis multivariante.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

En el estudio fueron incluidos de forma prospectiva 102 pacientes con diagnóstico anatomopatológico final de carcinoma no microcítico de pulmón en estadio I, II y IIIA sometidos a resección quirúrgica completa y que no habían recibido tratamiento neoadyuvante.

5.1.1 Datos Clínicos

Los 102 pacientes en el momento de la intervención tenían edades comprendidas entre los 30 y los 80 años, con una edad media de 66 años. El 87.9% (89) eran varones y el 12.75% (13) mujeres. Sólo el 9.8% no habían sido nunca fumadores. En cuanto a la intervención en el 42.2% de casos se realizó por videotoracoscopia (VATS) y en la mayoría de casos el tipo de resección realizada fue una lobectomía pulmonar. En cuanto al tratamiento adyuvante, 39 pacientes recibieron quimioterapia adyuvante consistente en la mayoría de casos en cuatro ciclos de un doblete con platino.

| | | N | % |
|---------------|----------------|--------------|--------|
| Sexo | Masculino | 89 | 87.30% |
| | Femenino | 13 | 12.80% |
| Edad | Media | 66,1 (30-80) | |
| | <70 años | 60 | 58.00% |
| | ≥70 años | 42 | 41.20% |
| Tabaquismo | Exfumador | 63 | 61.80% |
| | No | 10 | 9.80% |
| | Sí | 30 | 28.00% |
| PET (SUV) | Media | 11,0(1,6-26) | |
| | <7 | 25 | 24.50% |
| | ≥7 | 71 | 69.60% |
| | NA | 6 | 5.90% |
| Hemitórax | D | 59 | 57.80% |
| | I | 43 | 42.20% |
| Abordaje | Toracotomía | 59 | 57.80% |
| | VATS | 43 | 42.20% |
| Resección | Lobectomía | 84 | 82.40% |
| | Neumonectomía | 18 | 17.60% |
| | Segmentectomía | 8 | 7.80% |
| Quimioterapia | Sí | 39 | 38.24% |
| | No | 63 | 61.76% |

Tabla 3. Análisis descriptivo de las principales variables clínicas y referentes al tratamiento. Frecuencia absoluta (N) y relativa (%). VATS: abordaje mediante cirugía videoasistida. SUV: Standard uptake value en la PET

5.1.2 Datos patológicos

En cuanto a la estirpe histológica la mitad de pacientes presentaban un carcinoma epidermoide, más de la mitad con un grado histológico 2 (moderadamente diferenciado). En cuanto al estadio, el 47% se encontraban en un estadio patológico I y solo el 17.6% en estadio III. El tamaño tumoral en más de la mitad de los casos superaba los 3 cm. de diámetro máximo y el 74.5% de pacientes no tenían afectación ganglionar.

| | | N | % |
|----------------------|----------------|------------------|--------|
| Histología | Adenocarcinoma | 47 | 46.1% |
| | Escamoso | 50 | 49% |
| | Otro | 5 | 4.9% |
| Grado Histológico | G1 | 6 | 5.90% |
| | G2 | 62 | 60.8% |
| | G3-G4 | 17 | 16.70% |
| | NA | 17 | 16.70% |
| Estadios patológicos | IA | 24 | 23.50% |
| | IB | 24 | 23.50% |
| | IIA | 23 | 22.50% |
| | IIB | 13 | 12.70% |
| | IIIA | 18 | 17.60% |
| Estadio N | N0 | 76 | 74.51% |
| | N1 | 15 | 14.71% |
| | N2 | 11 | 10.78% |
| Tamaño tumoral | Media | 3.9cm (0,8-19cm) | |
| | <3cm | 40 | 39.20% |
| | ≥3cm | 62 | 60.80% |

Tabla 4. Análisis descriptivo de las principales variables patológicas. Frecuencia absoluta (N) y relativa (%).

5.2 DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

En la primera determinación realizada antes de la intervención (CTC1) se detectaron CTCs en la sangre periférica de 40 pacientes (39,2%). El número medio de CTCs aisladas en esta primera determinación fue de 8,5 CTCs/10ml de sangre.

En la segunda determinación (CTC2) llevada a cabo un mes tras la cirugía, 28 de los 102 pacientes incluidos fueron positivos para la presencia de CTCs (27,5%) con una media de 0,8 CTCs/10 ml de sangre periférica.

El porcentaje de pacientes en los que se detectaron CTCs tras la intervención (CTC2) fue inferior a la primera determinación (CTC1), de un 27.45% frente a un 39.2% respectivamente ($p=0.051$) (Gráfico 1)

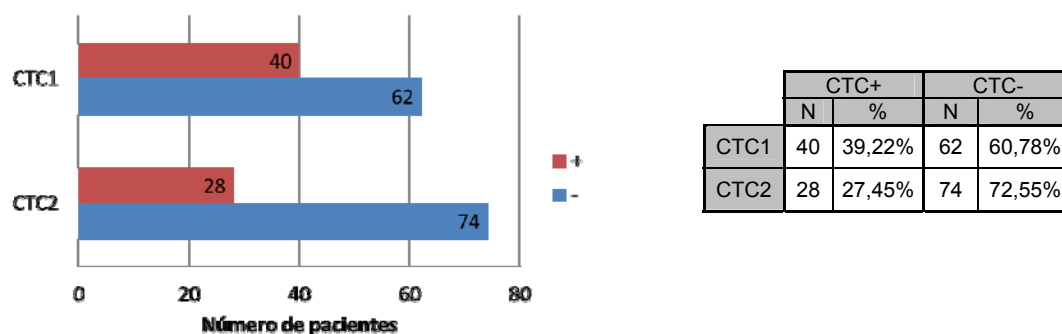


Gráfico 1 - Presencia (+) o ausencia (-) de CTCs antes de la cirugía (CTC1) y un mes tras la intervención (CTC2)

El número de CTCs aisladas fue igualmente inferior tras la cirugía con una media de 2.1 células por 10 ml de sangre en la primera determinación frente a 0.8 en la segunda ($p= 0.126$). (Tabla 5)

| | MEDIA | RANGO | |
|------|-------|-------|------|
| | | mín. | máx. |
| CTC1 | 2.1 | 0 | 84 |
| CTC2 | 0.8 | 0 | 10 |

Tabla 5 - Niveles de CTCs detectados antes de la Cirugía (CTC1) y un mes tras la intervención (CTC2)

5.3 ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CTCs Y VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se analizó la posible asociación entre la presencia o ausencia de CTCs antes de la intervención (CTC1) y tras la cirugía (CTC2) con las distintas variables clínico-patológicas (Tabla 6).

No se encontró asociación con la edad, en cuanto al sexo se observó una tendencia significativa presentando las mujeres una mayor prevalencia de CTCs basal ($p=0.053$). En la segunda determinación tras la cirugía el porcentaje de pacientes con CTCs fue mayor a mayor estadio, con un 42.1% de pacientes en estadio III con presencia de CTCs en sangre periférica frente a un 16.7% para el estadio III ($p=0.055$).

En lo referente, a la intervención el número de pacientes con CTCs fue significativamente menor tras abordaje videotoracoscópico (16.28%) en comparación con la cirugía abierta (35.59%).

| | | CTC 1 | | | CTC 2 | | |
|-----------------------|----------------|--------------------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|-------|
| | | N (%) POSITIVOS | N (%) NEGATIVOS | P | N (%) POSITIVOS | N (%) NEGATIVOS | P |
| Edad (años) | <70 años | 20 (33.30%) | 40 (66.7%) | 0.146 | 20 (33.3%) | 40 (66.70%) | 0.172 |
| | ≥70 años | 20 (47.60%) | 22 (52.4%) | | 8 (19.00%) | 20 (33.3%) | |
| Sexo | Hombres | 38 (42.70%) | 51 (57.30%) | 0.053 | 24 (26.97%) | 63 (74.12%) | 0.503 |
| | Mujeres | 2 (15.38%) | 11 (84.62%) | | 4 (30.77%) | 11 (73.33%) | |
| Estadio patológico | I | 21 (43.75%) | 27 (56.25%) | 0.445 | 8 (16.67%) | 40 (83.33%) | 0.055 |
| | II | 14 (40.00%) | 21 (60.00%) | | 12 (34.29%) | 23 (65.71%) | |
| | III | 5 (26.32%) | 14 (73.68%) | | 8 (42.11%) | 12 (57.89%) | |
| Tamaño tumoral | <3 cm | 16 (37.21%) | 27 (62.79%) | 0.415 | 10 (23.26%) | 33 (76.74%) | 0.263 |
| | >3 cm | 24 (41.38%) | 34 (58.62%) | | 18 (31.03%) | 40 (68.97%) | |
| Afectación ganglionar | N0 | 30 (39.47%) | 46 (60.53%) | 0.559 | 21 (27.63%) | 55 (72.37%) | 0.508 |
| | N1-N2 | 10 (38.46%) | 16 (61.54%) | | 7 (26.92%) | 19 (73.08%) | |
| Grado Histológico | G1-G2 | 28 (41.18%) | 40(58.82%) | 0.439 | 19 (27.94%) | 49 (72.06%) | 0.375 |
| | G3-G4 | 6 (35.29%) | 11 (64.71%) | | 6 (35.29%) | 11 (64.71%) | |
| Histología | Adenocarcinoma | 14 (29.8%) | 33 (70.2%) | 0.185 | 12 (25.5%) | 35 (74.5%) | 0.783 |
| | Escamosos | 24(48.0%) | 26 (52.00%) | | 14 (28.0%) | 36 (72%) | |
| | Otros | 2 (40.00%) | 3 (60.00%) | | 2 (40.00%) | 3(60.00%) | |
| Abordaje quirúrgico | VATS | 18 (41.86%) | 25 (58.14%) | 0.396 | 7 (16.28%) | 36 (83.72%) | 0.025 |
| | Toracotomía | 22 (37.29%) | 37 (62.71%) | | 21 (35.59%) | 38 (64.41%) | |
| Tipo de resección | Otro | 34 (40.96%) | 49 (59.04%) | 0.221 | 25 (30.12%) | 58 (69.88%) | 0.196 |
| | Neumonectomía | 5 (27.78%) | 13 (72.22%) | | 3 (16.67%) | 15 (83.33%) | |

Tabla 6 - Análisis univariante de la asociación entre la presencia o ausencia de CTCs antes (CTC1) y después de la intervención (CTC2) y las principales variables clínico patológicas

5.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CTCs

Además de la detección y enumeración, las CTCs fueron caracterizadas de acuerdo a la expresión fenotípica del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

En la primera determinación de los 40 caso en los que se detectaron CTCs en sangre periférica, 27 de ellos (67.5%) expresaban EGFR (CTCsEGFR1+). En la segunda determinación en 11 (39.3%) de los 28 casos con CTCs positivas se encontró expresión para EGFR (CTCsEGFR2+). (Gráfico 2)

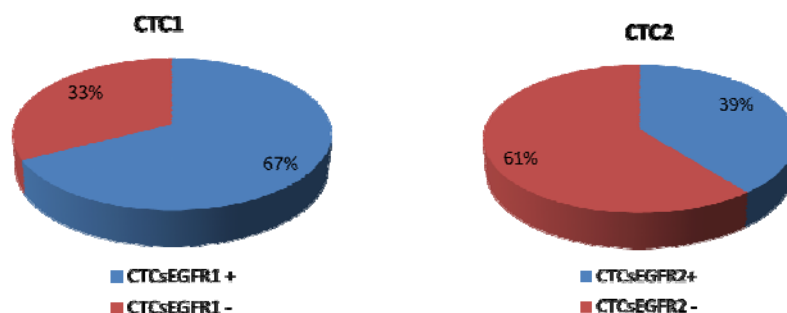


Gráfico 2 - Porcentaje de CTCs que expresan EGFR antes (CTC1) y después (CTC2) de la intervención.

5.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE CTCsEGFR+ Y VARIABLES CLÍNICOPATOLÓGICAS

Se analizó la posible asociación entre la presencia o ausencia de CTCs que expresaran EGFR (CTCsEGFR+) y las principales variables clínico patológicas (Tabla 7). No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa entre la presencia de CTCs con expresión de EGFR y las variables clínico patológicas analizadas.

| | | CTCsEGFR 1 | | | CTCsEGFR 2 | | |
|-----------------------|----------------|--------------------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|-------|
| | | N (%) POSITIVOS | N (%) NEGATIVOS | P | N (%) POSITIVOS | N (%) NEGATIVOS | P |
| Sexo | Hombres | 25 (28.09%) | 64 (71.91%) | 0.273 | 10 (11.24%) | 79 (88.76%) | 0.576 |
| | Mujeres | 2 (15.38%) | 11 (84.62%) | | 1 (7.96%) | 12 (92.31%) | |
| Estadio | I | 14 (29.17%) | 34 (70.83%) | 0.205 | 6 (12.50%) | 42 (87.50%) | 0.904 |
| | II | 11 (31.43%) | 24 (68.57%) | | 3 (8.57%) | 32 (91.43%) | |
| | III | 2 (10.53%) | 17 (89.47%) | | 2 (10.53%) | 17 (89.47%) | |
| Tamaño Tumoral | <3cm | 11 (25.58%) | 32 (74.42%) | 0.503 | 4 (9.30%) | 39 (90.70%) | 0.458 |
| | >3cm | 16 (27.59%) | 42 (72.41%) | | 7 (12.07%) | 51 (87.93%) | |
| Afectación ganglionar | N0 | 21 (27.73%) | 55 (72.37%) | 0.430 | 10 (13.16%) | 66 (86.84%) | 0.171 |
| | N1-N2 | 6 (23.08%) | 20 (76.92%) | | 1 (3.85%) | 25 (96.15%) | |
| Grado Histológico | G1-G2 | 17 (25.00%) | 51 (75.00%) | 0.285 | 7 (10.29%) | 61 (89.71%) | 0.575 |
| | G3-G4 | 6 (35.29%) | 11 (64.71%) | | 2 (11.76%) | 15 (88.24%) | |
| Histología | Adenocarcinoma | 12 (25.50%) | 35 (74.50%) | 0.780 | 3 (6.40%) | 44 (93.60%) | 0.268 |
| | Escamosos | 13 (26.00%) | 37 (74.00%) | | 7 (14.00%) | 43 (86.00%) | |
| | Otros | 2 (40.00%) | 3 (60.00%) | | 1 (20.00%) | 4 (80.00%) | |
| Abordaje quirúrgico | Toracotomía | 13 (30.23%) | 30 (69.77%) | 0.305 | 4 (9.30%) | 39 (90.70%) | 0.470 |
| | VATS | 14 (23.73%) | 45 (76.27%) | | 7 (11.86%) | 52 (88.14%) | |
| Tipo de resección | Otro | 22 (26.51%) | 61 (73.49%) | 0.481 | 10 (12.05%) | 73 (87.95%) | 0.377 |
| | Neumonectomía | 4 (22.22%) | 14 (77.78%) | | 1 (5.56%) | 17 (94.44%) | |

Tabla 7 - Análisis univariante de la asociación entre la presencia o ausencia de CTCsEGFR+ antes (CTCsEGFR1) y después de la intervención (CTCsEGFR2) y las principales variables

5.6 RESULTADOS DE DEL SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES

Con un seguimiento medio de 18 meses (rango 3-34 meses) 36 pacientes (35.3%) de los 102 incluidos en el estudio presentaron una recurrencia, en 10 casos se trató de una recidiva local, en 9 fue a distancia y en 16 casos presentaron una recidiva local y a distancia.



Gráfico.3 Distribución de los tipos de recurrencia

Hasta la finalización del seguimiento 25 (24.5%) pacientes murieron, 16 de ellos con evidencia de enfermedad.

Al final del seguimiento 77 pacientes continuaban vivos, 20 de ellos habían presentado o presentaban una recurrencia.



Gráfico 4 Estado de los pacientes al final del seguimiento

ER: evidencia de recurrencia. SER: sin evidencia de recurrencia

5.6.1 SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA SERIE

La supervivencia global de la serie a los 12 meses fue del 87.2%, a los 24 meses del 72.9% y a los 34 meses del 63.1%

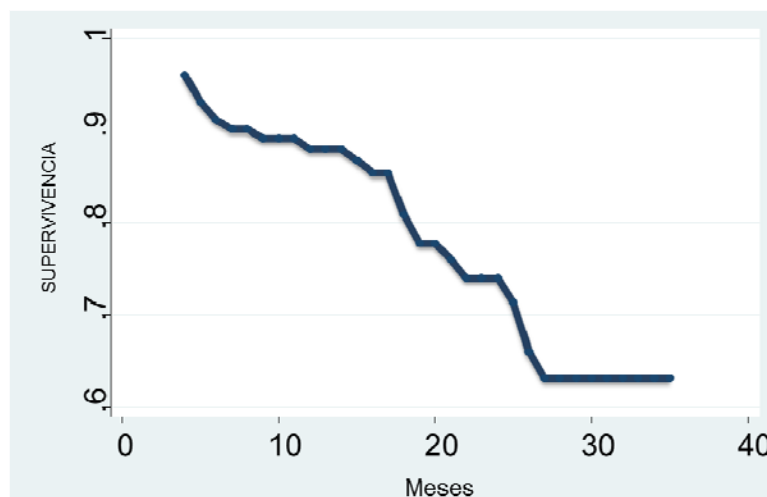


Gráfico 5 - Curva de supervivencia global de la serie

5.6.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD DE LA SERIE

La supervivencia libre de enfermedad de la serie a los 12 meses fue del 71.5%, a los 24 meses del 59.1% y a los 34 meses del 53.2%

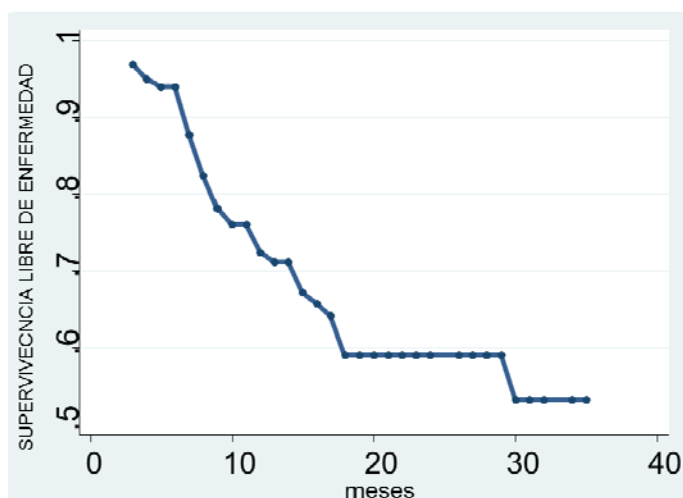


Gráfico 6 - Curva de supervivencia libre de enfermedad de la serie

5.7 IMPACTO PRONÓSTICO DE LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CTCs EN PACIENTES CON CPMN SOMETIDOS A TRATAMIENTO QUIRÚRGICO RADICAL

Para determinar el valor pronóstico de la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes intervenidos con carácter radical por un CPMN se realizó un análisis de su asociación con la aparición de recurrencias, así como un análisis de la supervivencia global y libre de enfermedad.

5.7.1 ANÁLISIS DE RECURRENCIA

Con un seguimiento medio de 18 meses (rango 3-34 meses) 36 pacientes (35.3%) de los 102 incluidos en el estudio presentaron una recurrencia. Hasta la finalización del seguimiento 25 (24.5%) pacientes fallecieron, 16 de ellos con evidencia de enfermedad.

Se analizó la asociación entre la aparición de recurrencias y el resto de variables clínico patológicas. Así mismo se determinó la posible asociación entre recurrencia y la presencia o ausencia de CTCs y CTCsEGFR+ (ver Tabla 8).

De los 40 pacientes que presentaban CTCs positivas en la primera determinación 15 (37.5%) presentaron una recurrencia.

En el caso de la segunda determinación 16 de los 28 pacientes positivos para CTC2 desarrollaron una recurrencia (57.14%)

Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre recurrencia y estadio de tal forma que los pacientes con estadio I presentaron un 20.83% de recurrencias en comparación con los pacientes en estadio III que presentaron recurrencias en el 63.16%. ($p=0.004$). Así mismo la existencia de una afectación ganglionar N1-N2 se asoció a un mayor porcentaje de recurrencias, que fue del 55,6% frente al 28% en pacientes sin afectación ganglionar.

Con respecto a la asociación entre la aparición de recurrencias y la presencia o ausencia de CTCs no se encontró asociación con respecto a la primera determinación. Sin embargo la segunda detección tras la intervención sí se correlacionó de forma muy significativa con la aparición de una recurrencia, de tal forma que 16 de los 28 (57.14%) pacientes que fueron positivos para la segunda determinación desarrollaron durante el seguimiento una recurrencia. Frente al 27% de recurrencias en pacientes con CTC2 negativa ($p=0.006$).

| | | RECURRENCIA | | |
|--------------------------|----------------|-------------|-------------|--------------|
| | | No | Sí | p |
| Edad (años) | <70 | 37 (61.70%) | 23 (38.30%) | 0.529 |
| | ≥70 | 29 (69.00%) | 13 (31.00%) | |
| Sexo | Mujer | 8 (61.54%) | 5 (38.46%) | 0.767 |
| | Hombre | 58 (65.17%) | 31 (34.83%) | |
| Tipo histológico | Adenocarcinoma | 31 (64.58%) | 17 (36.20%) | 0.951 |
| | Escamoso | 33 (66.00%) | 17 (34.00%) | |
| | Otros | 3 (60.00%) | 2 (40.00%) | |
| PET (SUV) | <7 | 14 (53.85%) | 12 (46.15%) | 0.235 |
| | ≥7 | 52 (68.42%) | 24 (31.58%) | |
| Estadios TNM patológicos | I | 38 (79.17%) | 10 (20.83%) | 0.004 |
| | II | 21 (60.00%) | 14 (40.00%) | |
| | III | 7 (36.84%) | 12 (63.16%) | |
| Tamaño tumoral (cm) | <3 | 28 (70.00%) | 12 (30.00%) | 0.403 |
| | ≥3 | 38 (61.30%) | 24 (38.70%) | |
| Estadio N | NO | 54 (72.00%) | 21 (28.00%) | 0.010 |
| | N1-N2 | 12 (44.40%) | 14 (53.85%) | |
| Abordaje quirúrgico | VATS | 31 (72.09%) | 12 (27.91%) | 0.212 |
| | Toracotomía | 35 (59.32%) | 24 (40.68%) | |
| Tipo de resección | Lobectomía | 57 (67.47%) | 27 (32.53%) | 0.182 |
| | Neumonectomía | 9 (50.00%) | 9 (50.00%) | |
| Quimioterapia adyuvante | NO | 45 (71.43%) | 18 (28.57%) | 0.089 |
| | SÍ | 21 (53.85%) | 18 (46.15%) | |
| CTC1 | NO | 41 (66.13%) | 21 (33.87%) | 0.832 |
| | SÍ | 25 (62.50%) | 15 (37.50%) | |
| CTC2 | NO | 54 (72.97%) | 20 (27.03%) | 0.006 |
| | SÍ | 12 (42.86%) | 16 (57.14%) | |
| CTCsEGFR1 | NO | 49 (65.33%) | 16 (34.67%) | 0.819 |
| | SÍ | 17 (62.96%) | 10 (37.04%) | |
| CTCsEGFR2 | NO | 60 (65.93%) | 61 (34.07%) | 0.512 |
| | SÍ | 6 (54.55%) | 5 (45.45%) | |

Tabla 8 - Asociación entre la aparición de recurrencias y las variables clínico patológicas así como la presencia de CTCs. CTC1: CTCs en la primera determinación previa a la cirugía. CTC2: CTCs en la segunda determinación un mes tras la cirugía. CTCsEGFR1: CTCs que expresan EGFR en la primera determinación. CTCsEGFR2: CTCs que expresan EGFR en la segunda determinación

5.7.2 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Se realizó un análisis univariante y multivariante de la influencia de los principales factores clínico - patológicos así como de la detección de CTCs.

1. ANÁLISIS UNIVARIANTE

Para determinar la asociación entre la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad y las diferentes variables se realizó un análisis de regresión de Cox univariante. En la tablas se resumen el análisis univariante efectuado sobre las principales variables clínico-patológicas así como con la detección de CTCs.

En el análisis univariante el estadio patológico se asoció de forma significativa a un mayor riesgo de recurrencia y una menor SLE. Estadio II (Hazard ratio: 2.36 [1.02-5.19]). Estadio III (Hazard ratio: 3.68 [2.11-11.56]). Así mismo la afectación ganglionar N1-N2 mostró significación estadística, llegando casi a triplicar el riesgo de recurrencia tumoral respecto a los casos sin afectación ganglionar (Hazard ratio: 2.88 [1.46-5.67]). Con respecto a las variables relacionadas con el tratamiento ninguna de ellas mostró asociación estadísticamente significativa con la SLE, el tipo de resección fue el que más se aproximó a la significación (Hazard ratio: 1.83 [0.86-3.89] p=0.14).

| ANÁLISIS UNIVARIANTE SLE | | | | |
|--------------------------|-------------------|-----------|------------|--------|
| FACTORES PRONÓSTICOS | HR | 95% IC | p | |
| CTC 1 + | 0.98 | 0.50-1.90 | 0.953 | |
| CTC 2 + | 2.44 | 1.26-4.72 | 0.009 | |
| CTCsEGFR1 + | 0.920 | 0.44-1.91 | 0.82 | |
| CTCsEGFR2 + | 1.27 | 0.49-3.28 | 0.628 | |
| Estadio TNM | I | | | |
| | II | 2.36 | 1.02-5.19 | 0.044 |
| | III | 3.68 | 2.11-11.56 | <0.001 |
| Tamaño tumoral(cm) | ≥3 | 1.85 | 0.64-5.32 | 0.256 |
| | <3 | | | |
| Afectación ganglionar | N1-N2 | 2.88 | 1.46-5.67 | 0.004 |
| | N0 | | | |
| Tipo Histológico | Otro | 1.01 | 0.51-1.97 | 0.98 |
| | Adenocarcinoma | | | |
| Vía de abordaje | Toracotomía | 1.44 | 0.72-2.88 | 0.29 |
| | Videotoracoscopia | | | |
| Tipo de resección | Neumonectomía | 1.83 | 0.86-3.89 | 0.14 |
| | Otro | | | |
| Quimioterapia adyuvante | Sí | 1.61 | 0.84-3.11 | 0.15 |
| | No | | | |

Tabla 9 - Análisis mediante regresión de cox univariante de la supervivencia libre de enfermedad en función de los principales factores pronosticos clínico patológicos y en función de la presencia o ausencia de CTCs y CTCsEGFR

En cuanto a la asociación entre la presencia de CTCs con la aparición de recurrencias, la segunda determinación se asoció de forma significativa a una menor SLE, de tal forma que estos pacientes con CTC2+ presentaron 2.44 veces más riesgo de recurrencia que los pacientes en los que no se detectaron CTCs un mes tras la intervención. La primera determinación, así como la presencia de CTCsEGFR+ no mostraron ninguna influencia estadísticamente significativa en la SLE.

Curvas de Supervivencia Libre de Enfermedad

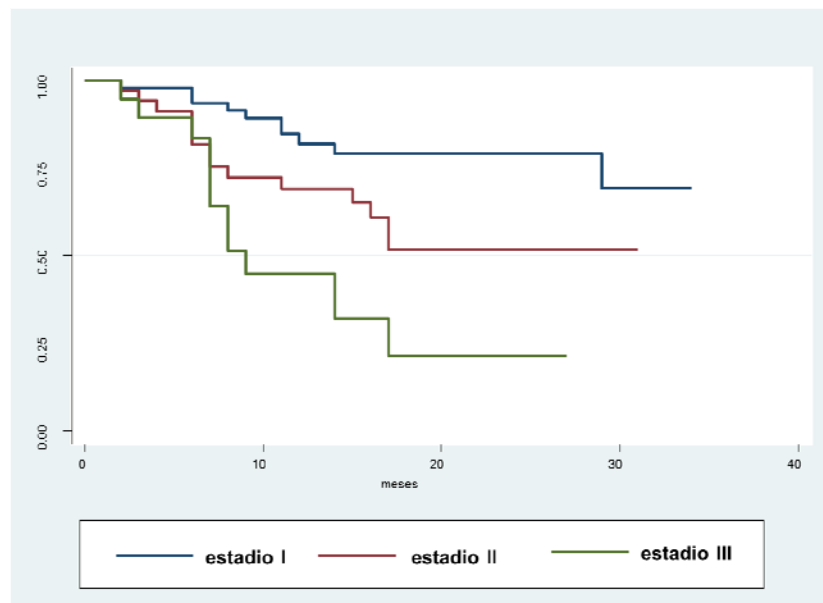


Gráfico 7 - Supervivencia libre de enfermedad en función del estadio I, II, III

Log Rank test $p < 0.001$

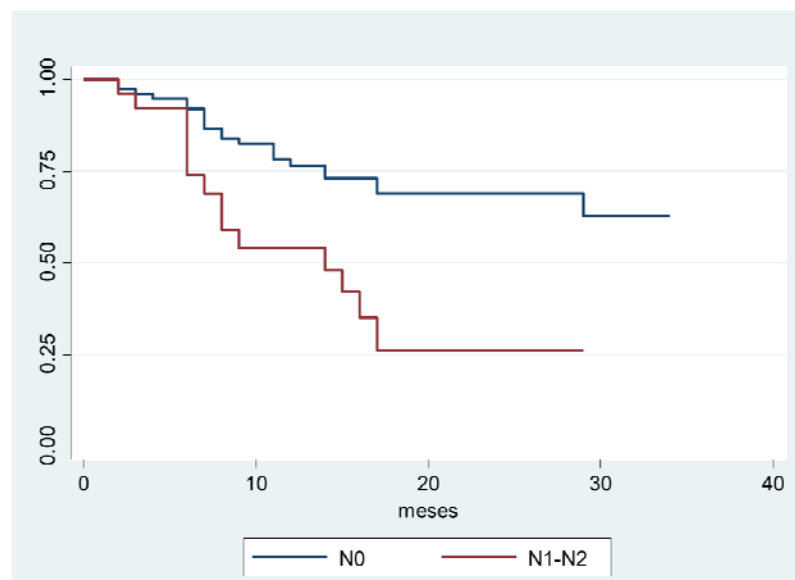


Gráfico 8 - Supervivencia libre de enfermedad en función del status nodal

Log Rank test $p = 0.001$

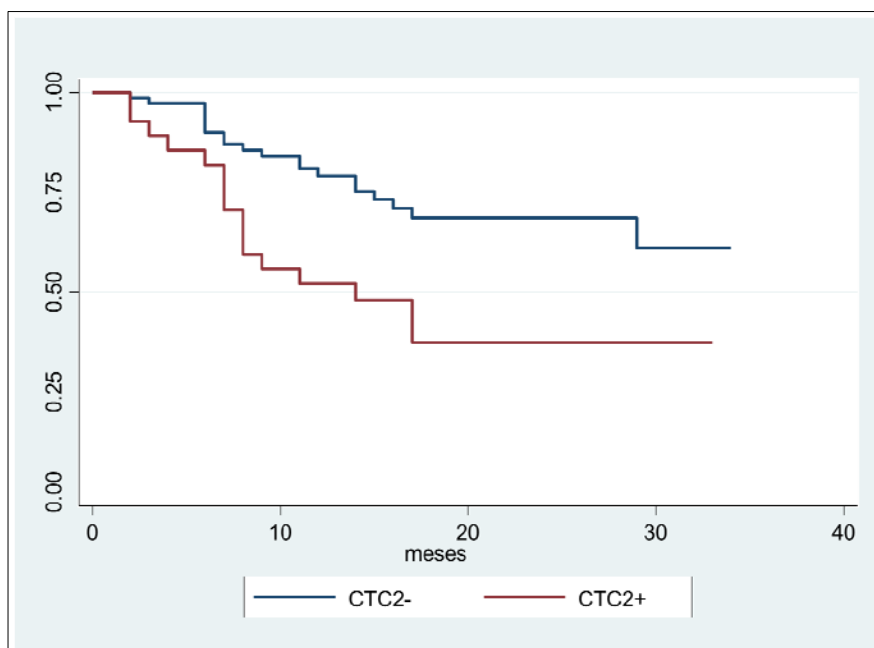


Gráfico 9 - Supervivencia libre de enfermedad en función de la presencia de CTCs un mes tras la intervención (CTC2)

La supervivencia libre de enfermedad a los 12 meses para pacientes en los que no fueron detectadas CTCs en la segunda determinación (CTC2-) fue de 79.1% frente al 59.5% en los pacientes en los que sí se detectaron CTCs en la segunda determinación (CTC2+) (Log Rank test $p=0.005$).

2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Se realizó un análisis multivariante mediante regresión de COX para determinar el efecto de la presencia de CTCs en la segunda determinación (CTC2) sobre la SLE. Tras completar el análisis se construyó un modelo en el que se incluyeron 3 variables: Estadio patológico, tipo de resección y presencia de CTCs en la segunda determinación (CTC2) (Tabla

| ANÁLISIS MULTIVARIANTE | | | | |
|------------------------|---------------|------|------------|-------|
| FACTORES PROGNÓSTICOS | | HR | 95% IC | p |
| CTC 2 + | | 3.72 | 1.53-9.01 | 0.004 |
| Estadio | I | | | |
| | II | 2.19 | 0.88-5.40 | 0.088 |
| | III | 3.11 | 1.11-8.74 | 0.031 |
| Tipo de resección | Neumonectomía | 2.44 | 0.940-6.34 | 0.067 |
| | Otro | | | |

Tabla 10 - Modelo análisis multivariante mediante regresión de Cox. CTC2+: presencia de CTCS un mes tras la intervención

De acuerdo a este modelo el estadio patológico III se asoció de forma independiente y significativa a un mayor riesgo de recurrencia.

La presencia de CTCs tras la intervención fue un factor pronóstico independiente asociado a una menor SLE, los pacientes con CTC2+ presentaron 3.7 veces mayor riesgo de recurrencia que los pacientes en los que no se detectaron CTCs poscirugía.

5.7.3 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL

Se realizó un análisis univariante y multivariante de la influencia de los principales factores clínico patológicos así como de la detección de CTCs sobre la supervivencia global.

1. ANÁLISIS UNIVARIANTE

Con el objeto de determinar la asociación entre la probabilidad de supervivencia global y las diferentes variables se realizó un análisis de regresión de Cox univariante. En la Tabla se resumen el análisis univariante efectuado sobre las principales variables clínico patológicas así como con la detección de CTCs.

En el análisis univariante el estadio patológico III se asoció de forma significativa a una peor supervivencia global, estos pacientes presentaron 3,2 veces mayor riesgo de muerte que los pacientes en estadio I. Junto al estadio patológico la afectación ganglionar N1-N2 se asoció igualmente a una peor SG.

En cuanto a la determinación de CTCs, la presencia o ausencia de CTCs antes o después de la intervención no mostraron asociación con la SG, la presencia de CTCSEGFR+ antes de la intervención fue la que más se aproximó a la significación estadística (Hazard ratio: 1.77 [0.79 -3.95]).

| ANÁLISIS UNIVARIANTE | | | | |
|-------------------------|-------------------------------|-------|--------------|---------|
| FACTORES PRONÓSTICOS | | HR | 95% IC | p |
| CTC 1 + | | 1.48 | 0.67 - 3.27 | 0.325 |
| CTC 2 + | | 1.18 | 0.51 - 2.74 | 0.69 |
| CTC 1 EGFR + | | 1.77 | 0.79 - 3.95 | 0.158 |
| CTC2 EGFR + | | 0.57 | 0.49 - 3.28 | 0.628 |
| Estadio TNM | I | | | |
| | II | 1.98 | 0.78 - 5.05 | 0.148 |
| | III | 3.20 | 2.11 - 11.56 | < 0.001 |
| Tamaño tumoral (cm) | ≥3 | 1.35 | 1.14 - 1.59 | < 0.001 |
| | <3 | | | |
| Afectación ganglionar | N1-N2 | 2.588 | 1.46 - 5.67 | 0.027 |
| | N0 | | | |
| Tipo Histológico | Otro | 2.657 | 0.57 - 12.33 | 0.212 |
| | Adenocarcinoma | | | |
| Vía de abordaje | Toracotomía | 1.233 | 0.54 - 2.79 | 0.615 |
| | Videotoracoscopia | | | |
| Tipo de resección | Neumonectomía | 1.595 | 0.63 - 4.02 | 0.322 |
| | Lobectomía/ segmentectomía | | | |
| Quimioterapia adyuvante | Sí | 1.229 | 0.56 - 2.71 | 0.608 |
| | No | | | |

Tabla 11 -

Curvas de Supervivencia global

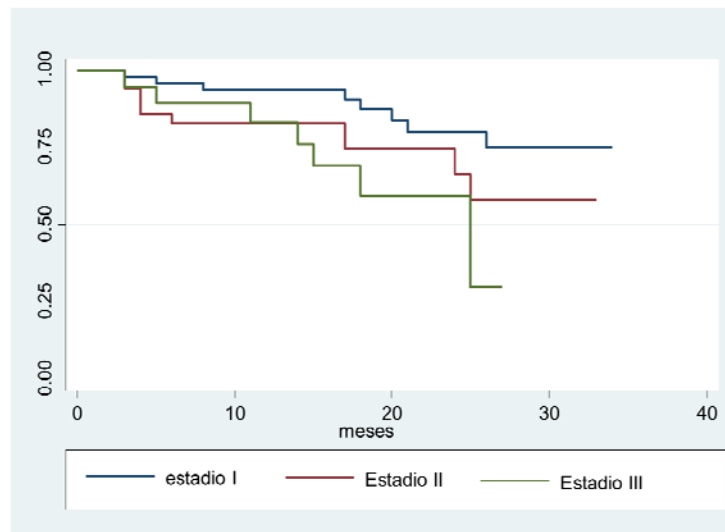


Gráfico 10 - Supervivencia global en función del estadio patológico I, II, III
Log Rank test $p=0.063$

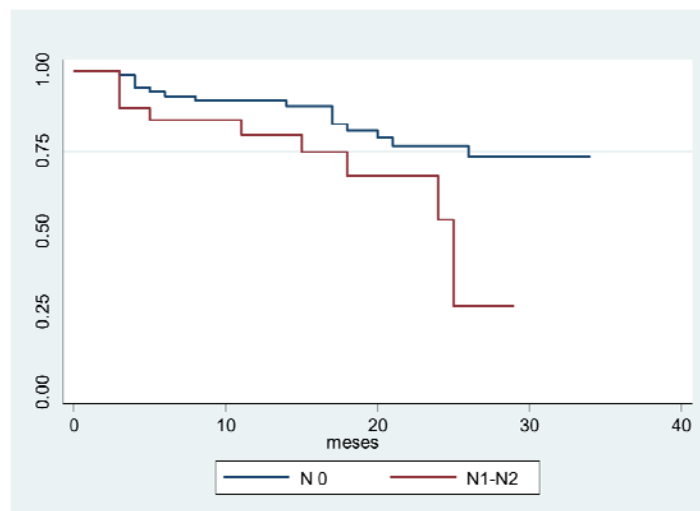


Gráfico 11 - Supervivencia global en función del estadio N.
Log Rank test $p=0.016$

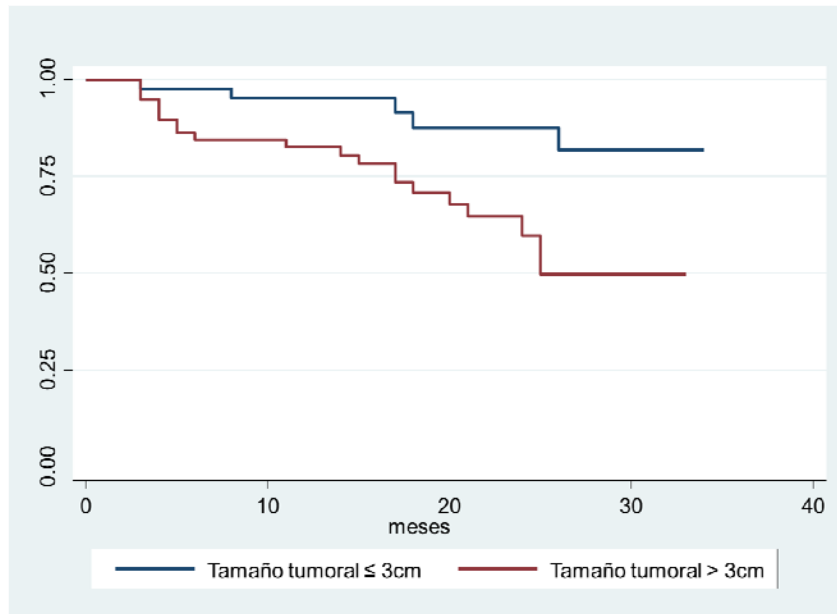


Gráfico 12 - Supervivencia global en función del tamaño tumoral.

Log Rank test $p=0.007$

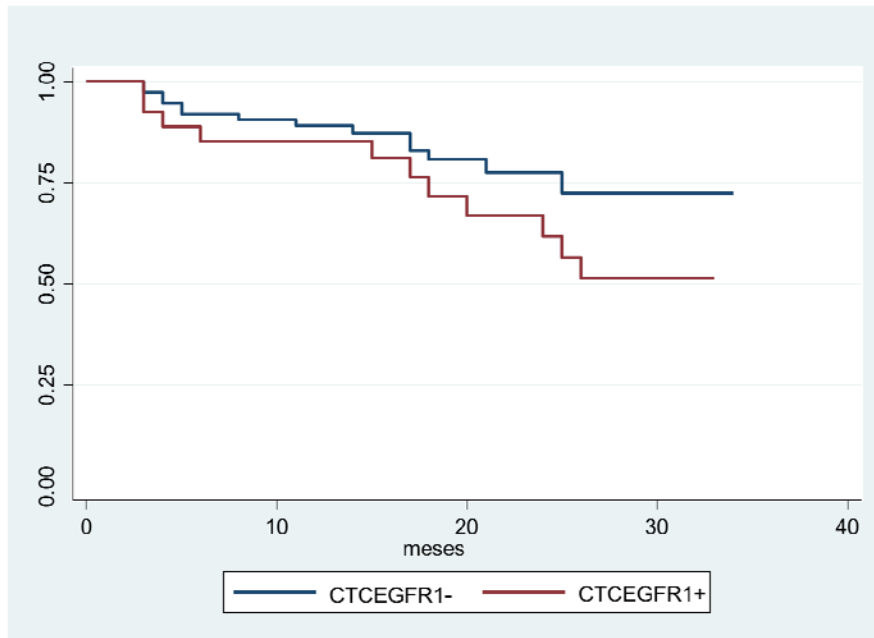


Gráfico 13 - Supervivencia global en función de la presencia o ausencia de CTCS con expresión de EGFR en la primera determinación (CTCEGFR1+)

Log Rank test $p=0.148$

2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

En el modelo final de análisis multivariante para supervivencia global se incluyeron cuatro variables: Estadio patológico, estadio N, tamaño tumoral y presencia de CTCsEGFR+ en la primera determinación (CTCEGFR1).

| ANÁLISIS MULTIVARIANTE SG | | | | |
|---------------------------|----------|-------|--------------|-------|
| FACTORES PROGNÓSTICOS | | HR | 95% IC | p |
| CTC EFGR 1+ | | 1.55 | 0.59 - 4.08 | 0.372 |
| Afectación ganglionar | N1-N2 | 3.73 | 0.67 - 13.41 | 0.097 |
| | N0 | | | |
| Estadio patológico | I | 0.589 | 0.17 - 2.06 | 0.410 |
| | II - III | | | |
| Tamaño tumoral | ≥3cm | 1.470 | 1.08 - 1.99 | 0.015 |
| | <3cm | | | |

Tabla 12 – Análisis Multivariante para SG

El tamaño tumoral mayor a 3 cm se asoció de forma significativa e independiente a una peor supervivencia global. La presencia de CTCs no mostró ser un factor pronóstico asociado a la SG en este análisis.

6. DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón constituye la principal causa de muerte atribuida a enfermedad tumoral en el mundo¹. A pesar de los avances en el tratamiento conseguidos en los últimos años, entre los que se incluye el abordaje multidisciplinar, el desarrollo de la cirugía mínimamente invasiva o las nuevas terapias dirigidas, la supervivencia global a los 5 años continua situándose en torno al 15%⁴⁹.

En los estadios iniciales del CPMN el tratamiento quirúrgico se considera el tratamiento más efectivo, consiguiendo los mejores resultados de supervivencia que oscilan entre el 60%-90% para el estadio I y el 30%-70% para el estadio II⁵⁰. Sin embargo a pesar de un adecuado tratamiento quirúrgico más de un 20% de pacientes desarrollarán una recurrencia y eventualmente morirán a causa de la enfermedad¹⁰¹.

En un intento por mejorar los resultados de SG y SLE de estos pacientes se han planteado diferentes esquemas de tratamiento adyuvante. Sin embargo solo se ha podido demostrar una discreta mejoría en la supervivencia para estadios II y III, pero no para el estadio I^{91-95,106}. Quizá este hecho pueda deberse a la dilución del efecto provocada por la administración de quimioterapia en pacientes sin enfermedad oculta y en los que en estadios tan precoces se ha conseguido realizar una resección completa y efectiva.

Este elevado porcentaje de recurrencias ha llevado a plantear la necesidad de nuevos factores pronósticos capaces de identificar a pacientes que pese a encontrarse en estadios iniciales de un CPNM presentan un peor pronóstico al esperado, con malos resultados en términos de SLE y SG. Dichos factores permitirían disponer además de una indicación más precisa para quimioterapia adyuvante tras resección completa, sólo en los casos en los que realmente exista un mayor riesgo de recurrencia.

Diversos estudios han mostrado la asociación de ciertos factores clínicos y patológicos con la aparición de una recurrencia tales como la edad, el tipo histológico o la invasión vascular^{54,109-112}. Sin embargo ninguno de ellos, además del estadio TNM, han demostrado ser determinantes ni establecer criterios universalmente aceptados en protocolos o guías para indicar un tratamiento adyuvante o un seguimiento más exhaustivo.

Junto a estos factores clínicos se han investigado diversos biomarcadores incluyendo alteraciones moleculares, como la mutación del EGFR o diversas firmas genéticas¹⁵². El papel del análisis genético en estadios avanzados ha quedado ampliamente demostrado, sin embargo en estadios iniciales es aún controvertido. La mayoría de ellos requieren además de métodos invasivos para su análisis, requiriendo de la obtención en muchos casos de una muestra histológica del tumor primario por métodos invasivos.

Como un nuevo factor pronóstico para estos pacientes ha sido propuesta la detección de CTCs en sangre periférica.

El objetivo fundamental de este estudio pretendía determinar el impacto clínico la detección y caracterización de CTCs como marcador pronóstico que nos permita identificar a pacientes con mayor riesgo de recurrencia y peor pronóstico al esperado.

En la actualidad sabemos que para que llegue a producirse una metastasis, necesariamente se requiere del vertido de células tumorales al torrente sanguíneo por donde circulen y sean capaces de sobrevivir¹⁵³. La detección de estas CTCs en sangre periférica ha demostrado tener valor pronóstico y predictivo en diferentes tipos de tumores de origen epitelial^{154,155}, como es el caso del cáncer de mama,^{9,156-161} el cáncer de colon¹⁶²⁻¹⁶⁵ y el de próstata¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

En lo que respecta al cáncer de pulmón varios grupos han investigado la implicación en el pronóstico y tratamiento que la detección de CTCs podría tener en pacientes con estadios avanzados, sometidos a quimioterapia^{153,169-172} En un estudio realizado por Krebs et al.¹⁷¹ en pacientes con estadio III-IV se analizan los niveles de CTCs antes y después del tratamiento con quimioterapia. Observaron que niveles iniciales de 5 o más CTCs antes del tratamiento representaba un factor pronóstico independiente de peor supervivencia global y libre de enfermedad. Así mismo encontraron que niveles persistentemente elevados tras el tratamiento implicaban un mal pronóstico.

Sin embargo son escasas las publicaciones al respecto del valor pronóstico de las CTCs en pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico^{137,173-182}. De ellas la mayoría se tratan de estudios con un número de pacientes reducido, que han empleado diferentes metodologías para la detección de CTCs, y en muchos casos con una sola determinación antes de la cirugía. A pesar de la falta de homogeneidad, sus resultados apuntan a que la presencia de CTCs constituye un factor de mal pronóstico en los pacientes intervenidos por CPNM.

Uno de ellos se trata de un estudio realizado por Tanaka et al. en el que se incluyó a 150 pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico, realizando una sola determinación antes de la cirugía. Los pacientes se encontraban en diferentes estadios (I-IV) y emplearon para la detección el método semiautomático Cell Search. La prevalencia de CTCs fue del 30.6% y encontraron una correlación entre el número de CTCs y el estadio, así como una asociación de los niveles de CTCs con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad¹⁷⁵.

En otro trabajo realizado por Hofman et al. igualmente con una sola determinación previa a la cirugía, se empleó una técnica de aislamiento por tamaño (ISET), en pacientes con estadios I-IV. La proporción de pacientes con CTCs positivas antes de la cirugía fue de un 49% y encontraron que un nivel de 50 CTCs o más se relacionaba de forma significativa con una peor SG y SLE¹⁷⁴.

En un estudio a pequeña escala realizado por Rolle et al. sí se realizaron determinaciones posteriores a la intervención, concretamente a las dos semanas de la cirugía y a los 5 meses. Incluyen 30 pacientes empleando para la

detección una técnica denominada MAINTRAC basada en el análisis celular mediante el uso de citometría de flujo. Observaron que los pacientes con un incremento de CTCs durante el seguimiento presentaban un mayor riesgo de recurrencia¹³⁷.

En otros dos estudios en los que se empleó la plataforma CellSearch, basada en la selección positiva inmunomagnética para el aislamiento y detección de CTCs, no se encontró asociación entre la presencia de CTCs y el pronóstico^{176,177}. En ambos estudios las determinaciones de CTCs se realizaron inmediatamente después de la cirugía. Conjuntamente con el análisis de CTCs en sangre periférica, estos estudios también analizaron la presencia de CTCs en vena pulmonar al finalizar la intervención. Al igual que con los resultados del análisis de CTCs en sangre periférica, tampoco se encontró asociación entre la presencia de CTCs en el postoperatorio inmediato y el desarrollo de metástasis.

Por otra parte en el estudio realizado por Sawabata¹⁵⁶ et al. se describe como las CTCs detectadas 10 días después de la intervención, desaparecen. Estos resultados confirman la hipótesis de que durante la cirugía un número significativo de CTCs pueden pasar a la sangre, pero el valor pronóstico, en cuanto a su papel en el desarrollo de posteriores metástasis, que su presencia puede tener no ha podido, aun, ser demostrado. Una posible explicación de la falta de correlación entre la presencia de las CTCs inmediatamente después de la cirugía y las posteriores recaídas, podría ser el hecho de que un gran número de estas CTCs no sobreviven y realmente se trata de células apoptóticas y que son potencialmente eliminadas por el sistema inmune. En concordancia a esto, varios estudios en modelos animales han mostrado que pasadas 24 horas tras la administración intravenosa de células tumorales solo un 0,01% de ellas eran aún viables pasado ese periodo¹⁶².

Basándonos en estos antecedentes, el estudio basó el análisis de la segunda determinación en un plazo no inferior a tres semanas tras la cirugía.

Por otra parte en el estudio realizado por Sawabata¹⁷⁷ et al. se describe a como las CTCs habían desaparecido 10 días tras la intervención. Estos resultados confirman la hipótesis de que durante la cirugía un número significativo de CTCs pueden pasar a la sangre, pero el valor pronóstico, en cuanto a su papel en el desarrollo de posteriores metástasis, que su presencia puede tener, no ha podido aun ser demostrado. Una posible explicación de la falta de correlación entre la presencia de las CTCs inmediatamente después de la cirugía y las posteriores recaídas, podría ser el hecho de que un gran número de estas CTCs no sobreviven y realmente se trata de células apoptóticas y que son potencialmente eliminadas por el sistema inmune. En concordancia a esto, varios estudios en modelos animales han mostrado que pasadas 24 horas tras la administración intravenosa de células tumorales solo un 0,01% de ellas eran aún viables pasado ese periodo¹⁸³.

Basándonos en estos antecedentes, el estudio basó el análisis de la segunda determinación en un plazo no inferior a tres semanas tras la cirugía.

poder determinar con mejor exactitud la prevalencia real de CTCs después de la resección pulmonar.

En nuestro estudio se detectaron CTC en 40 de los 102 pacientes (39,2%) antes de la cirugía con una media de 2.1 CTCs por cada 10 ml. Este porcentaje es similar al encontrado en el estudio realizado por Yoon et al¹⁸² en el se incluyó a 79 pacientes en estadios patológicos I-III, realizando al igual que en nuestro trabajo dos determinaciones, antes de la intervención y aproximadamente un mes tras la misma.

En la segunda determinación realizada en nuestros pacientes observamos que este porcentaje descendió al 27.4% con una media de 0.8 células circulantes.

Este descenso en el porcentaje de pacientes con CTCs positiva puede ser atribuido al efecto de una cirugía radical curativa y ha sido observado en estudio previos, como el anteriormente mencionado de Yoon et al¹⁸² o en trabajos realizados sobre detección de CTCs en otros campos, como un reciente estudio en el que se observa una negativización de CTCs tras peritonectomía en carcinomatosis peritoneal.

La negativización de CTCs podría suponer que la resección completa ha sido efectiva y el paciente se encuentra libre de enfermedad tras la misma.

Por el contrario la presencia de CTCs un mes tras la intervención podría indicar la persistencia de enfermedad en forma de posibles micrometástasis no detectables por métodos convencionales, que podrían constituir un nuevo origen de CTCs una vez que el tumor primario ha sido resecado.

En nuestro estudio la presencia de CTCs tras la cirugía se asoció de forma significativa a la aparición de recurrencias y a una peor SLE.

En los pacientes en los que se detectaron CTCs tras la intervención el porcentaje de recurrencias fue del 57.1% frente a un 27% en aquellos en los que la segunda determinación fue negativa.

Así mismo la SLE fue significativamente más corta en los pacientes con presencia de CTCs un mes tras la operación, siendo la SLE al año para estos pacientes del 59.1% frente al 79.1% observada en pacientes en los que no pudo detectarse CTCs en la segunda determinación.

En el análisis multivariante la presencia de CTCs tras la intervención fue el factor pronóstico con mayor influencia sobre la SLE, presentando estos pacientes hasta 3.72 veces mayor riesgo de recurrencia que los pacientes sin CTCs tras la cirugía.

La detección de CTCs en la sangre periférica podría por tanto ser empleada como un método poco invasivo para determinar el pronóstico de estos pacientes e indicar así mismo la necesidad de un seguimiento postoperatorio estrecho así como la indicación de un tratamiento adyuvante.

Por otra parte, en nuestro estudio no encontramos asociación entre la primera determinación y el pronóstico. En dos de los estudios previamente mencionados realizados por Tanaka¹⁷⁵ y Hofman¹⁷⁴ sí encontraron una asociación entre la presencia preoperatoria de CTCs y la SG y/o SLE. En ambos se realizó una sola determinación antes de la cirugía, e incluyeron a pacientes en estadios avanzados. En los otros estudios descritos con anterioridad en los que sí se realizaron determinaciones tras la cirugía y pasado el postoperatorio inmediato encontraron, de acuerdo a nuestros resultados, que eran las determinaciones posteriores a la intervención las que tenían una mayor influencia en el pronóstico^{137,182}.

Junto a su valor pronóstico se ha estudiado la posible asociación entre la detección de CTCs y diferentes variables clínico patológicas. La asociación más frecuentemente analizada ha sido con el estadio TNM encontrándose en algunos estudios una mayor presencia y niveles de CTCs en estadios avanzados¹⁷¹ En cambio en otros como en el estudio de Hofman¹⁷³ no observaron asociación entre CTCs y el estadio, así como tampoco con el resto de variables clínicas o patológicas analizadas. En nuestro estudio encontramos un mayor porcentaje de pacientes con CTCs positivas en la segunda determinación en estadios II y III, aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas.

Resulta interesante el hecho de que la única variable con la que encontramos una asociación significativa fue la vía de abordaje, detectándose un mayor porcentaje de pacientes CTC2+ tras toracotomía en comparación con el abordaje VATS. En este sentido un trabajo de Huang et al¹⁸¹ aún pendiente de publicación en el que se realizan tres determinaciones, antes de la intervención durante la misma y a los tres días de la cirugía, encuentran un incremento de CTCs tras la operación pero describen que este incremento fue significativamente inferior tras VATS en comparación con la toracotomía. Sin embargo no fue analizado el valor pronóstico de estos hallazgos.

Los últimos estudios publicados al respecto han puesto de manifiesto la importancia de analizar no sólo la presencia o niveles de CTCs sino también las características fenotípicas y moleculares de las mismas^{169,183-185} Se ha visto que las CTCs presentan una gran heterogeneidad, y que sólo algunas de ellas con particulares características serán capaces de dar lugar a metástasis, la caracterización de este subgrupo es un aspecto fundamental en la investigaciones sobre CTCs¹⁸⁶.

Nuestro estudio realizamos adicionalmente una caracterización fenotípica de las CTCs en función de la expresión de EGFR. La presencia de CTCsEGFR+ no mostró asociación con ninguna variable clínico patológica y tampoco mostró ninguna influencia significativa en el pronóstico. La presencia de CTCsEGFR+ antes de la intervención mostró una tendencia a una peor SG, como vimos en las curvas de supervivencia, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística.

Junto a la caracterización fenotípica la caracterización molecular está siendo objeto cada vez de un mayor interés. El análisis genético permitiría detectar mutaciones genéticas en CTCs que pueden corresponderse o no con las presentes en las células del tumor primario, y que pueden tener implicaciones fundamentales en la aparición de resistencias al tratamiento, en el pronóstico y en la aparición de recidivas¹⁸³.

El creciente interés en la caracterización molecular de las CTCs está íntimamente relacionado con el desarrollo de terapias dirigidas y la medicina personalizada en Oncología. Recientes estudios apuntan a que muchas de las alteraciones genómicas (mutaciones o reordenamientos) que ocurren en las células tumorales pueden ser potenciales dianas para tratamientos dirigidos. La lista de potenciales alteraciones genómicas es larga y afecta a la mayoría de casos reflejando una gran heterogeneidad molecular en el CPNM. Algunas de ellas como las mutaciones del EGFR son ahora determinadas de forma rutinaria en estadio avanzados de CPNM.

Algunos estudios han mostrado la posibilidad de determinar mutaciones del EGFR en CTCS o bien en DNA libre en plasma (114,115). Sin embargo la detección en plasma se ha asociado a un número significativo de falsos negativos, de ahí el interés de su detección directamente en CTCs. Lo que ofrecería la posibilidad de realizar un estudio molecular por un método poco invasivo como un análisis de sangre. Futuros estudios tendrán que determinar el valor pronóstico y predictivo que puede tener la caracterización genética de CTCs en estadios precoces del CPNM.

En definitiva la determinación y caracterización de CTCS en pacientes con estadios precoces puede ser una herramienta de gran valor en relación al pronóstico y tratamiento de pacientes con tratamiento quirúrgico de un CPNM.

Para nuestro conocimiento este estudio es el primero a gran escala en el que se realizan dos determinaciones antes de la intervención y tras la misma en un grupo homogéneo de pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico radical. Los resultados descritos muestran como la presencia de CTCs un mes tras la intervención se asocia a un peor pronóstico.

7. CONCLUSIONES

1. Es posible la detección y caracterización de CTCs en pacientes con CPNM sometidos a tratamiento quirúrgico radical
2. El porcentaje de pacientes en los que se detectaron CTCs fue inferior en la segunda determinación, realizada un mes tras la intervención.
3. La presencia de CTCs tras la cirugía se asoció de forma significativa a un mayor porcentaje de recurrencias en pacientes con CPNM reseado.
4. La detección de CTCs tras la intervención fue un factor pronóstico independiente asociado a una peor SLE.
5. En pacientes con resección radical de un CPNM en los que se pretenda determinar el pronóstico en base a la detección de CTCs, una sola determinación preoperatoria será insuficiente, debiéndose realizar una segunda determinación tras la cirugía, pero preferiblemente pasado el periodo del postoperatorio inmediato.
6. El porcentaje de pacientes con CTCs fue inferior tras cirugía videoasistida en comparación con los casos en los que la resección pulmonar fue realizada por toracotomía.
7. La detección de CTCs podría constituir un factor pronóstico capaz de identificar a pacientes que pese a encontrarse en estadios iniciales y ser sometidos a un tratamiento quirúrgico radical presentan una recurrencia precoz, pudiendo por tanto constituir una indicación para un tratamiento adyuvante.
8. La detección y caracterización de CTCs podría contribuir a la estratificación del riesgo de recurrencia en estadios iniciales de un CPNM. Serán necesarios nuevos estudios para confirmar dichos hallazgos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
2. Jemal A, Simard EP, Dorell C, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(3):175-201.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403.
4. United States. Public Health Service. Office of the Surgeon General., National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (U.S.). Office on Smoking and Health. *The health consequences of smoking--50 years of progress : a report of the Surgeon General*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2014.
5. I A. Primary malignant growth of the lung and bronchi. New York. Longmans Green1912.
6. R. P. Tobacco smoking and longevity. Vol 87(2253). *Science*1938:216-217.
7. DOLL R, HILL AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J*. 1950;2(4682):739-748.
8. Hecht SS. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int J Cancer*. 2012;131(12):2724-2732.
9. Lee W, Jiang Z, Liu J, et al. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature*. 2010;465(7297):473-477.
10. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):605-644.
11. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997;315(7114):980-988.
12. Fontham ET, Correa P, Reynolds P, et al. Environmental tobacco smoke and lung cancer in nonsmoking women. A multicenter study. *JAMA*. 1994;271(22):1752-1759.
13. Driscoll T, Nelson DI, Steenland K, et al. The global burden of disease due to occupational carcinogens. *Am J Ind Med*. 2005;48(6):419-431.
14. Isidro Montes I, Abu Shams K, Alday E, et al. [Guidelines on asbestos-related pleuropulmonary disease]. *Arch Bronconeumol*. 2005;41(3):153-168.
15. Markowitz SB, Levin SM, Miller A, Morabia A. Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer. New findings from the North American insulator cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(1):90-96.
16. Neuberger JS, Field RW. Occupation and lung cancer in nonsmokers. *Rev Environ Health*. 2003;18(4):251-267.
17. Darby S, Hill D, Auvinen A, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 2005;330(7485):223.
18. Barros-Dios JM, Barreiro MA, Ruano-Ravina A, Figueiras A. Exposure to residential radon and lung cancer in Spain: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol*. 2002;156(6):548-555.
19. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 Suppl):e1S-29S.

20. Díez Herranz A. [COPD and lung cancer: practical implications]. *Arch Bronconeumol*. 2001;37(5):240-247.
21. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):5-8.
22. Yang IA, Holloway JW, Fong KM. Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *J Thorac Dis*. 2013;5 Suppl 5:S454-462.
23. Schwartz AG. Genetic predisposition to lung cancer*. *Chest*. 2004;125(5_suppl):86S-89S.
24. Chen PF, He XF, Huang GH, Wang W, Qiu ZH. Association Between the CYP1B1 Polymorphisms and Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Technol Cancer Res Treat*. 2015.
25. Chen XP, Xu WH, Xu DF, Xie XH, Yao J, Fu SM. GSTM1 polymorphisms and lung cancer risk in the Chinese population: a meta-analysis based on 47 studies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(18):7741-7746.
26. Li W, Song LQ, Tan J. Combined effects of CYP1A1 MspI and GSTM1 genetic polymorphisms on risk of lung cancer: an updated meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014;35(9):9281-9290.
27. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1681-1690.
28. Sardenberg RA, Mello ES, Younes RN. The lung adenocarcinoma guidelines: what to be considered by surgeons. *J Thorac Dis*. 2014;6(Suppl 5):S561-567.
29. Johnson DH, Schiller JH, Bunn PA. Recent clinical advances in lung cancer management. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):973-982.
30. Travis WD, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer., International Association for the Study of Lung Cancer., International Academy of Pathology. *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus, and heart*. Lyon: IARC Press; 2004.
31. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):244-285.
32. Zugazagoitia J, Enguita AB, Nuñez JA, Iglesias L, Ponce S. The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: current concepts and future prospects. *J Thorac Dis*. 2014;6(Suppl 5):S526-536.
33. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013;31(8):992-1001.
34. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):97S-104S.
35. Spiro SG, Gould MK, Colice GL, Physicians ACoC. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):149S-160S.
36. Sánchez de Cos J. El cáncer de pulmón en España. Epidemiología, supervivencia y tratamientos actuales. Vol 45. *Arch Bronconeumol* 2009:341-348.
37. Walter FM, Rubin G, Bankhead C, et al. Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer: a prospective cohort study. *Br J Cancer*. 2015;112(s1):S6-S13.

38. Pinilla I, Gómez León N. Utilidad de la PET/TC en el cáncer de pulmón. *Radiología*. 2009;51(03):248-260.
39. Chao F, Zhang H. PET/CT in the Staging of the Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012.
40. Gould MK, Fletcher J, Iannettoni MD, et al. Evaluation of patients with pulmonary nodules: When is it lung cancer?*: accp evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3_suppl):108S-130S.
41. Nair A, Klusmann MJ, Jogeessvaran KH, Grubnic S, Green SJ, Vlahos I. Revisions to the TNM staging of non-small cell lung cancer: rationale, clinicoradiologic implications, and persistent limitations. *Radiographics*. 2011;31(1):215-238.
42. PF D. The TNM staging system. Vol 7. Paris: Bull Inst Nat Hyg; 1952:743.
43. Mountain CF, Carr DT, Anderson WA. A system for the clinical staging of lung cancer. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1974;120(1):130-138.
44. Mountain CF. Lung cancer staging classification. *Clin Chest Med*. 1993;14(1):43-53.
45. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 1997;111(6):1710-1717.
46. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007;2(8):706-714.
47. Sánchez de Cos J, Hernández Hernández J, Jiménez López MF, Padrones Sánchez S, Rosell Gratacós A, Rami Porta R. Normativa SEPAR sobre estadificación del cáncer de pulmón. *Archivos de Bronconeumología*. 2011;47(09):454-465.
48. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007;2(8):694-705.
49. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2011;378(9804):1727-1740.
50. Novello S, Asamura H, Bazan J, et al. Early stage lung cancer: progress in the last 40 years. *J Thorac Oncol*. 2014;9(10):1434-1442.
51. Tanoue LT, Detterbeck FC. New TNM classification for non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(4):413-423.
52. Van Schil PE, Balduyck B, De Waele M, Hendriks JM, Hertoghs M, Lauwers P. Surgical treatment of early-stage non-small-cell lung cancer. *EJC Supplements*. 11(2):110-122.
53. Detterbeck FC, Gibson CJ. Turning gray: the natural history of lung cancer over time. *J Thorac Oncol*. 2008;3(7):781-792.
54. Brunelli A, Charloux A, Bolliger CT, et al. ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy). *European Respiratory Journal*. 2009;34(1):17-41.
55. Rami-Porta R, Wittekind C, Goldstraw P. Complete resection in lung cancer surgery: proposed definition. *Lung Cancer*. 49(1):25-33.
56. Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. Treatment of stage i and ii non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: american college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5_suppl):e278S-e313S.
57. EA G, J S. The *successful removal of anentire lung for carcinoma of the bronchus*. Vol 101: JAMA; 1933:1371-1374.

58. Cahan WG. RADICAL LOBECTOMY. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1960;39(5):555-572.
59. Johnston JB, Jones PH. The Treatment of Bronchial Carcinoma by Lobectomy and Sleeve Resection of the Main Bronchus. *Thorax*. 1959;14(1):48-54.
60. Lee ES, Park SI, Kim YH, et al. Comparison of Operative Mortality and Complications between Bronchoplastic Lobectomy and Pneumonectomy in Lung Cancer Patients. *J Korean Med Sci*. 2007;22(1):43-47.
61. Ginsberg RJ, Rubinstein LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(3):615-622; discussion 622-613.
62. Landreneau RJ, Normolle DP, Christie NA, et al. Recurrence and Survival Outcomes After Anatomic Segmentectomy Versus Lobectomy for Clinical Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer: A Propensity-Matched Analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(23):2449-2455.
63. Nakamura K, Saji H, Nakajima R, et al. A Phase III Randomized Trial of Lobectomy Versus Limited Resection for Small-sized Peripheral Non-small Cell Lung Cancer (JCOG0802/WJOG4607L). *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2010;40(3):271-274.
64. Lardinois D, De Leyn P, Van Schil P, et al. ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2006;30(5):787-792.
65. Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1978;76(6):832-839.
66. Rusch VW, Crowley J, Giroux DJ, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007;2(7):603-612.
67. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, et al. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;4(5):568-577.
68. Detterbeck F, Puchalski J, Rubinowitz A, Cheng D. Classification of the thoroughness of mediastinal staging of lung cancer. *Chest*. 2010;137(2):436-442.
69. Shapiro M, Kadakia S, Lim J, et al. Lobe-specific mediastinal nodal dissection is sufficient during lobectomy by video-assisted thoracic surgery or thoracotomy for early-stage lung cancer. *Chest*. 2013;144(5):1615-1621.
70. Izbicki JR, Passlick B, Karg O, et al. Impact of radical systematic mediastinal lymphadenectomy on tumor staging in lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 1995;59(1):209-214.
71. Izbicki JR, Passlick B, Pantel K, et al. Effectiveness of radical systematic mediastinal lymphadenectomy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of a prospective randomized trial. *Ann Surg*. 1998;227(1):138-144.
72. Ishiguro F, Matsuo K, Fukui T, Mori S, Hatooka S, Mitsudomi T. Effect of selective lymph node dissection based on patterns of lobe-specific lymph node metastases on patient outcome in patients with resectable non-small cell lung cancer: a large-scale retrospective cohort study applying a propensity score. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(4):1001-1006.

73. Wu Y, Huang ZF, Wang SY, Yang XN, Ou W. A randomized trial of systematic nodal dissection in resectable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002;36(1):1-6.
74. Darling GE, Allen MS, Decker PA, et al. Randomized trial of mediastinal lymph node sampling versus complete lymphadenectomy during pulmonary resection in the patient with N0 or N1 (less than hilar) non-small cell carcinoma: results of the American College of Surgery Oncology Group Z0030 Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;141(3):662-670.
75. Darling GE, Allen MS, Decker PA, et al. Number of lymph nodes harvested from a mediastinal lymphadenectomy: results of the randomized, prospective American College of Surgeons Oncology Group Z0030 trial. *Chest*. 2011;139(5):1124-1129.
76. McKenna RJ, Houck W, Fuller CB. Video-assisted thoracic surgery lobectomy: experience with 1,100 cases. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(2):421-425; discussion 425-426.
77. Handy JR, Asaph JW, Douville EC, Ott GY, Grunkemeier GL, Wu Y. Does video-assisted thoracoscopic lobectomy for lung cancer provide improved functional outcomes compared with open lobectomy? *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2010;37(2):451-455.
78. Walker WS, Codisoti M, Soon SY, Stamenkovic S, Carnochan F, Pugh G. Long-term outcomes following VATS lobectomy for non-small cell bronchogenic carcinoma. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2003;23(3):397-402.
79. Swanson SJ, Herndon JE, D'Amico TA, et al. Video-assisted thoracic surgery lobectomy: report of CALGB 39802--a prospective, multi-institution feasibility study. *J Clin Oncol*. 2007;25(31):4993-4997.
80. Scott WJ, Allen MS, Darling G, et al. Video-assisted thoracic surgery versus open lobectomy for lung cancer: a secondary analysis of data from the American College of Surgeons Oncology Group Z0030 randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(4):976-981; discussion 981-973.
81. Flores RM, Park BJ, Dycoco J, et al. Lobectomy by video-assisted thoracic surgery (VATS) versus thoracotomy for lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;138(1):11-18.
82. Cattaneo SM, Park BJ, Wilton AS, et al. Use of video-assisted thoracic surgery for lobectomy in the elderly results in fewer complications. *Ann Thorac Surg*. 2008;85(1):231-235; discussion 235-236.
83. Zhang Z, Zhang Y, Feng H, et al. Is video-assisted thoracic surgery lobectomy better than thoracotomy for early-stage non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013;44(3):407-414.
84. Taioli E, Lee DS, Lesser M, Flores R. Long-term survival in video-assisted thoracoscopic lobectomy vs open lobectomy in lung-cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013;44(4):591-597.
85. Cao C, Manganas C, Ang SC, Yan TD. A meta-analysis of unmatched and matched patients comparing video-assisted thoracoscopic lobectomy and conventional open lobectomy. *Ann Cardiothorac Surg*. 2012;1(1):16-23.
86. Yan TD, Black D, Bannon PG, McCaughan BC. Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(15):2553-2562.

87. Chen FF, Zhang D, Wang YL, Xiong B. Video-assisted thoracoscopic surgery lobectomy versus open lobectomy in patients with clinical stage I non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2013;39(9):957-963.
88. Li Z, Liu H, Li L. Video-assisted thoracoscopic surgery versus open lobectomy for stage I lung cancer: A meta-analysis of long-term outcomes. *Exp Ther Med*. 2012;3(5):886-892.
89. Zhang R, Ferguson MK. Video-Assisted versus Open Lobectomy in Patients with Compromised Lung Function: A Literature Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(7):e0124512.
90. Alam N, Flores RM. Video-assisted thoracic surgery (VATS) lobectomy: the evidence base. *JLS*. 2007;11(3):368-374.
91. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ : British Medical Journal*. 1995;311(7010):899-909.
92. Pignon J-P, Tribodet H, Scagliotti GV, et al. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(21):3552-3559.
93. Strauss GM, Herndon JE, Maddaus MA, et al. Adjuvant Paclitaxel Plus Carboplatin Compared With Observation in Stage IB Non-Small-Cell Lung Cancer: CALGB 9633 With the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(31):5043-5051.
94. Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus Cisplatin vs. Observation in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(25):2589-2597.
95. 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(1):29-34.
96. Kelsey CR, Marks LB, Hollis D, et al. Local recurrence after surgery for early stage lung cancer: an 11-year experience with 975 patients. *Cancer*. 2009;115(22):5218-5227.
97. Kelsey CR, Higgins KA, Peterson BL, et al. Local recurrence after surgery for non-small cell lung cancer: a recursive partitioning analysis of multi-institutional data. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;146(4):768-773.e761.
98. Varlotto J, Recht A, Medford-Davis LN, Flickinger JC, DeCamp M. Locoregional recurrence of early-stage surgically resected non-small-cell lung cancer: the importance of close follow-up and consistent definitions. *Ann Oncol*. 2013;24(6):1711-1712.
99. Baba T, Uramoto H, Takenaka M, et al. Prognostic factors before and after recurrence of resected non-small cell lung cancer. *Respir Investig*. 2012;50(4):151-156.
100. Uramoto H, Tanaka F. Recurrence after surgery in patients with NSCLC. *Transl Lung Cancer Res*. 2014;3(4):242-249.
101. Song IH, Yeom SW, Heo S, et al. Prognostic factors for post-recurrence survival in patients with completely resected Stage I non-small-cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2014;45(2):262-267.
102. Hung JJ, Hsu WH, Hsieh CC, et al. Post-recurrence survival in completely resected stage I non-small cell lung cancer with local recurrence. *Thorax*. 2009;64(3):192-196.

103. Su S, Scott WJ, Allen MS, et al. Patterns of survival and recurrence after surgical treatment of early stage non-small cell lung carcinoma in the ACOSOG Z0030 (ALLIANCE) trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147(2):747-752: Discussion 752-743.
104. Zhu C-Q, Tsao M-S. Prognostic markers in lung cancer: is it ready for prime time? *Translational Lung Cancer Research*. 2014;3(3):149-158.
105. Shepherd FA, Tsao M-S. Unraveling the Mystery of Prognostic and Predictive Factors in Epidermal Growth Factor Receptor Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(7):1219-1220.
106. 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(9):719-727.
107. Sculier JP, Chansky K, Crowley JJ, Van Meerbeeck J, Goldstraw P, Institutions ISCaP. The impact of additional prognostic factors on survival and their relationship with the anatomical extent of disease expressed by the 6th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors and the proposals for the 7th Edition. *J Thorac Oncol*. 2008;3(5):457-466.
108. Rami-Porta R, Asamura H, Goldstraw P. Predicting the prognosis of lung cancer: the evolution of tumor, node and metastasis in the molecular age—challenges and opportunities. *Translational Lung Cancer Research*. 2015;4(4):415-423.
109. Koo HK, Jin SM, Lee CH, et al. Factors associated with recurrence in patients with curatively resected stage I-II lung cancer. *Lung Cancer*. 2011;73(2):222-229.
110. Varlotto J, Medford-Davis LN, Recht A, et al. Confirmation of the role of diabetes in the local recurrence of surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2012;75(3):381-390.
111. Varlotto JM, Yao AN, DeCamp MM, et al. Nodal stage of surgically resected non-small cell lung cancer and its effect on recurrence patterns and overall survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015;91(4):765-773.
112. Varella-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, et al. EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2009;62(11):970-977.
113. Cho S, Sung SW, Jheon S, Chung JH. Risk of recurrence in surgically resected stage I adenocarcinoma of the lung: histopathologic and immunohistochemical analysis. *Lung*. 2008;186(6):411-419.
114. Maeda R, Yoshida J, Ishii G, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Risk factors for tumor recurrence in patients with early-stage (stage i and ii) non-small cell lung cancer: Patient selection criteria for adjuvant chemotherapy according to the seventh edition tnm classification. *Chest*. 2011;140(6):1494-1502.
115. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013;5 Suppl 5:S479-490.
116. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):703-740.
117. Herbst RS, Sandler AB. Overview of the current status of human epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2004;6 Suppl 1:S7-S19.
118. Liu P, Morrison C, Wang L, et al. Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole-exome sequencing. *Carcinogenesis*. 2012;33(7):1270-1276.

119. Burotto M, Thomas A, Subramaniam D, Giaccone G, Rajan A. Biomarkers in early-stage non-small-cell lung cancer: current concepts and future directions. *J Thorac Oncol*. 2014;9(11):1609-1617.
120. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor and in KRAS Are Predictive and Prognostic Indicators in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Chemotherapy Alone and in Combination With Erlotinib. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(25):5900-5909.
121. Shepherd FA, Rosell R. Weighing tumor biology in treatment decisions for patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007;2 Suppl 2:S68-76.
122. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(10):947-957.
123. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-246.
124. Izar B, Sequist L, Lee M, et al. The impact of EGFR mutation status on outcomes in patients with resected stage I non-small cell lung cancers. *Ann Thorac Surg*. 2013;96(3):962-968.
125. Zhang Z, Wang T, Zhang J, et al. Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Resected Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e106053.
126. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N, et al. Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib. *J Thorac Oncol*. 2012;7(12):1815-1822.
127. Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:583929.
128. Graziano SL, Gu L, Wang X, et al. Prognostic significance of mucin and p53 expression in stage IB non-small cell lung cancer: a laboratory companion study to CALGB 9633. *J Thorac Oncol*. 2010;5(6):810-817.
129. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2000;6(10):4055-4063.
130. Chen P, Fan Y, Man TK, Hung YS, Lau CC, Wong ST. A gene signature based method for identifying subtypes and subtype-specific drivers in cancer with an application to medulloblastoma. *BMC Bioinformatics*. 2013;14 Suppl 18:S1.
131. Kratz JR, He J, Van Den Eeden SK, et al. A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. *Lancet*. 2012;379(9818):823-832.
132. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-1564.
133. Coghlin C, Murray GI. The role of gene regulatory networks in promoting cancer progression and metastasis. *Future Oncol*. 2014;10(5):735-748.
134. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006;127(4):679-695.
135. Monteiro J, Fodde R. Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives. *Eur J Cancer*. 2010;46(7):1198-1203.
136. Magbanua MJ, Das R, Polavarapu P, Park JW. Approaches to isolation and molecular characterization of disseminated tumor cells. *Oncotarget*. 2015;6(31):30715-30729.

137. Rolle A, Günzel R, Pachmann U, Willen B, Höffken K, Pachmann K. Increase in number of circulating disseminated epithelial cells after surgery for non-small cell lung cancer monitored by MAINTRAC(R) is a predictor for relapse: A preliminary report. *World J Surg Oncol*. 2005;3(1):18.
138. Reed J, Rosman M, Verbanac KM, Mannie A, Cheng Z, Tafra L. Prognostic implications of isolated tumor cells and micrometastases in sentinel nodes of patients with invasive breast cancer: 10-year analysis of patients enrolled in the prospective East Carolina University/Anne Arundel Medical Center Sentinel Node Multicenter Study. *J Am Coll Surg*. 2009;208(3):333-340.
139. Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev*. 2007;28(3):297-321.
140. Kuipers EJ, Rösch T, Bretthauer M. Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(3):130-142.
141. Mimeault M, Batra SK. New advances on critical implications of tumor- and metastasis-initiating cells in cancer progression, treatment resistance and disease recurrence. *Histol Histopathol*. 2010;25(8):1057-1073.
142. Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, Chong KK, Alix-Panabières C, Pantel K. Molecular mechanisms of metastasis. *J Surg Oncol*. 2011;103(6):508-517.
143. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013;31(6):539-544.
144. Mocellin S, Lise M, Nitti D. Targeted therapy for colorectal cancer: mapping the way. *Trends Mol Med*. 2005;11(7):327-335.
145. Ignatiadis M, Dawson SJ. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Ann Oncol*. 2014;25(12):2304-2313.
146. Fehm T, Becker S, Bachmann C, et al. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):942-947.
147. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2012;14(3):R71.
148. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-791.
149. Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. *Nat Protoc*. 2014;9(3):694-710.
150. Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(29):10501-10504.
151. Yusa A, Toneri M, Masuda T, et al. Development of a new rapid isolation device for circulating tumor cells (CTCs) using 3D palladium filter and its application for genetic analysis. *PLoS One*. 2014;9(2):e88821.
152. Coscio A, Chang DW, Roth JA, et al. Genetic variants of the Wnt signaling pathway as predictors of recurrence and survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Carcinogenesis*. 2014;35(6):1284-1291.
153. Hou JM, Krebs M, Ward T, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol*. 2011;178(3):989-996.
154. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol*. 2010;2(6):351-365.
155. Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(3):129-144.

156. Serrano MJ, Nadal R, Lorente JA, et al. Circulating cancer cells in division in an early breast cancer patient. *Ann Oncol.* 2011;22(9):2150-2151.
157. Serrano MJ, Lorente JA, Delgado Rodríguez M, et al. Circulating tumour cells in peripheral blood: potential impact on breast cancer outcome. *Clin Transl Oncol.* 2011;13(3):204-208.
158. Nadal R, Salido M, Nonell L, et al. Combined analysis of copy number alterations by single-nucleotide polymorphism array and MYC status in non-metastatic breast cancer patients: comparison according to the circulating tumor cell status. *Tumour Biol.* 2015;36(2):711-718.
159. Serrano MJ, Sánchez-Rovira P, Delgado-Rodríguez M, Gaforio JJ. Detection of circulating tumor cells in the context of treatment: prognostic value in breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(8):671-675.
160. Bidard FC, Pierga JY. Clinical utility of circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(14):1622.
161. Mostert B, Sieuwerts AM, Kraan J, et al. Gene expression profiles in circulating tumor cells to predict prognosis in metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2015;26(3):510-516.
162. Vidaurreta M, Sastre J, Sanz-Casla MT, Maestro ML, Rafael S, Díaz-Rubio E. [Detection and quantification of circulating tumor cells in peripheral blood in patients with colon cancer]. *Med Clin (Barc).* 2007;129(9):333-334.
163. Lu CY, Tsai HL, Uen YH, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining clinical outcome to mFOLFOX chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(4):791-797.
164. Thorsteinsson M, Söletormos G, Jess P. Low number of detectable circulating tumor cells in non-metastatic colon cancer. *Anticancer Res.* 2011;31(2):613-617.
165. Melero JT, Ortega FG, Gonzalez AM, et al. Prognostic factor analysis of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with peritoneal carcinomatosis of colon cancer origin treated with cytoreductive surgery plus an intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy procedure (CRS + HIPEC). *Surgery.* 2015.
166. Thalgott M, Heck MM, Eiber M, et al. Circulating tumor cells versus objective response assessment predicting survival in metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(8):1457-1464.
167. Alvarez-Cubero MJ, Vázquez-Alonso F, Puche-Sanz I, et al. Dormant Circulating Tumor Cells In Prostate Cancer: Biological, Clinical And Therapeutic Implications. *Curr Drug Targets.* 2015.
168. Friedlander TW, Fong L. The end of the beginning: circulating tumor cells as a biomarker in castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(11):1104-1106.
169. Wong MP. Circulating tumor cells as lung cancer biomarkers. *J Thorac Dis.* 2012;4(6):631-634.
170. Xu YH, Zhou J, Pan XF. Detecting circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14(3):10352-10358.
171. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(12):1556-1563.
172. Hirose T, Murata Y, Oki Y, et al. Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncol Res.* 2012;20(2-3):131-137.

173. Hofman V, Ilie MI, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer*. 2011;129(7):1651-1660.
174. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):827-835.
175. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6980-6986.
176. Okumura Y, Tanaka F, Yoneda K, et al. Circulating tumor cells in pulmonary venous blood of primary lung cancer patients. *Ann Thorac Surg*. 2009;87(6):1669-1675.
177. Sawabata N, Okumura M, Utsumi T, et al. Circulating tumor cells in peripheral blood caused by surgical manipulation of non-small-cell lung cancer: pilot study using an immunocytology method. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;55(5):189-192.
178. Kurusu Y, Yamashita J, Ogawa M. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in patients with resectable non-small-cell lung cancer. *Surgery*. 1999;126(5):820-826.
179. Yamashita J, Matsuo A, Kurusu Y, Saishoji T, Hayashi N, Ogawa M. Preoperative evidence of circulating tumor cells by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA is an independent predictor of survival in non-small cell lung cancer: a prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124(2):299-305.
180. Wendel M, Bazhenova L, Boshuizen R, et al. Fluid biopsy for circulating tumor cell identification in patients with early-and late-stage non-small cell lung cancer: a glimpse into lung cancer biology. *Phys Biol*. 2012;9(1):016005.
181. Huang HB, Ge MJ. The Effects of Different Surgical Approaches on the Perioperative Level of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2015.
182. Yoon SO, Kim YT, Jung KC, Jeon YK, Kim BH, Kim CW. TTF-1 mRNA-positive circulating tumor cells in the peripheral blood predict poor prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2011;71(2):209-216.
183. Hofman V, Ilie M, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells from lung cancer patients in the era of targeted therapy: promises, drawbacks and pitfalls. *Curr Mol Med*. 2014;14(4):440-456.
184. O'Flaherty JD, Gray S, Richard D, et al. Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer*. 2012;76(1):19-25.
185. Cho EH. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in lung cancer. *J Thorac Dis*. 2012;4(5):444-445.
186. Zhang Z, Shiratsuchi H, Lin J, et al. Expansion of CTCs from early stage lung cancer patients using a microfluidic co-culture model. *Oncotarget*. 2014;5(23):12383-12397.